

**DAS SCHICKSAL VON
BAKTERIELLEM LIPOPOLYSACCHARID IN VIVO**

**Untersuchungen über die Ausscheidung von Lipopolysaccharid
und von metabolischen Lipopolysaccharid-Derivaten
durch Meerkatzen und Ratten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der biologischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
in Freiburg**

1981

**vorgelegt von
Bernhard Kleine
aus Gelsenkirchen-Buer**

1980

**DAS SCHICKSAL VON
BAKTERIELLEM LIPOPOLYSACCHARID IN VIVO**

**Untersuchungen über die Ausscheidung von Lipopolysaccharid
und von metabolischen Lipopolysaccharid-Derivaten
durch Meerkatzen und Ratten**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde
der biologischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
in Freiburg**



**vorgelegt von
Bernhard Kleine
aus Gelsenkirchen-Buer**

1980

Dekan: Prof. Dr. G. Feix

Leiter der Arbeit: Prof. Dr. O. Westphal

Referent: Prof. Dr. O. Westphal

Korreferent: Prof. Dr. J. Weckesser

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses: 19. Feb. 1981



Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. O. Westphal, unter dessen Anleitung diese Dissertation stand, für viele Anregungen und Diskussionen im Verlauf der Arbeit.

Den Herren Dr. W. Falk und Dr. Ch. Galanos danke ich für zahlreiche Ratschläge und stete Unterstützung. Herrn Dr. O. Lüderitz verdanke ich viele wertvolle Anregungen, besonders bei der Anfertigung dieses Manuskriptes.

Besonders danke ich Frau Dr. Helms in Durban, Südafrika, für die Durchführung der Versuche an Meerkatzen.

Bei Fräulein C. Serr, Frau H. Wintersinger und Herrn R. Warth bedanke ich mich für freundliche technische Hilfe.

Allen Freunden und Kollegen am Institut, besonders Frau Dr. Marina Freudenberg, den Herren Dr. Ferber, Dr. Himmelsbach, Dr. Jensen, Dr. Jirillo, Dr. Mossmann, Dr. Rietschel und Dr. Schlecht danke ich für ihre Hilfe und Ratschläge, mit denen sie den Fortgang der Arbeit gefördert haben.

Bei Frau I. Kuttler und Frau R. Schneider möchte ich mich für die Erstellung des Manuskriptes bedanken.

Die finanzielle Unterstützung erfolgte durch die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

Abstract

Kleine, Bernhard

Doktorarbeit, Freiburg/Brsg., 1980

DAS SCHICKSAL VON BAKTERIELLEM LIPOPOLYSACCHARID IN VIVO - UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSSCHIEDUNG VON LIPOPOLY- SACCHARID UND VON METABOLISCHEN LIPOPOLYSACCHARID-DERI- VATEN DURCH MEERKATZEN UND RATTEN.

Nach Injektion radioaktiver Lipopolysaccharid-Präparate aus Salmonella abortus equi (LPS) in Meerkatzen und Ratten wurden Urin und Kot dieser Tiere auf isotonenmarkierte Substanzen hin untersucht. Geringe Teile der injizierten Radioaktivität wurden im Verlauf von zwei Wochen nach Injektion im Urin wiedergefunden (3-5%). Im Kot dagegen wurden bis zu 60% der verabreichten Radioaktivität im Verlauf von sieben Wochen ausgeschieden. Bei den radioaktiven Substanzen im Urin handelt es sich einmal um Wasser, das aus dem Abbau der Fettsäuren des LPS stammt, zum anderen um hoch- und nieder-molekulare Fraktionen von deacyliertem Polysaccharid. Die im Kot ausgeschiedenen Substanzen waren während der ersten Tage nach Injektion noch LPS-ähnlich, später wurde zunehmend ein deacyliertes Präparat ausgeschieden. Nach Ablauf von sieben Wochen enthält das im Kot ausgeschiedene Material nur noch zwei der sieben Fettsäuren der Lipoid-Komponente (Lipoid A) des Lipopolysaccharides. Erste Versuche, aus Kot die ausgeschiedene Substanz zu reisolieren, gelangen mit Hilfe von Elektrodialyse und Gelpermeationschromatographie.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Die Struktur von Endotoxin	2
1.1. Die O-spezifische Kette	4
1.2. Das Kernoligosaccharid	5
1.3. Das Lipoid A	8
2. Extraktion und Isolierung von Lipopolysaccharid von der Bakterienoberfläche	10
3. Physikochemische Eigenschaften von Lipopolysaccharid	12
4. Die Wirkung von Endotoxin im Organismus	14
5. Das Schicksal von Endotoxin im tierischen Organismus	17
6. Ziele und Aufgaben für die vorliegende Arbeit	18
B. EXPERIMENTELLER TEIL	20
1. Züchtung der Bakterien; Isolierung und Charakterisierung von Lipopolysaccharidpräparaten	20
1.1. Darstellung von nichtmarkiertem Lipopolysaccharid	20
1.2. Darstellung von radiomarkiertem ^3H , ^{14}C -Lipopolysaccharid	21
1.3. Charakterisierung des ^3H , ^{14}C -LPS-Präparates	23
1.3.1. Schwach saure Hydrolyse von ^3H , ^{14}C -LPS	23
1.3.2. Darstellung des fettsäurefreien Polysaccharides (LPS-hydraz.)	23
1.3.3. Darstellung der Fettsäuremethylester	24
1.4. Berechnung der Isotopenverteilung in ^3H , ^{14}C -LPS aus den Aktivitäten in Lipoid A, LPS-hydraz. und Fettsäuremethylestern	25
1.5. <u>Zusammenfassung von Kapitel 1.</u>	26
2. Untersuchungen an Urin und Kot von Meerkatzen und Ratten nach Injektion von radioaktiven LPS-Präparaten	28
2.1. Haltung der Tiere	28

- 2.1.1. Meerkatzen
- 2.1.2. Ratten
- 2.2. Ausscheidung im Meerkatzenurin
- 2.2.1. Urin nach Injektion von nichtmarkiertem LPS (Präparat 1)
- 2.2.2. Urin nach Injektion von Präparat 2 und Präparat 3
(^{14}C - und ^3H -LPS)
- 2.3. Ausscheidung in Urin und Kot von Ratten
- 2.3.1. Rattenurin nach Injektion von Präparat 4 und 5
(^{14}C -LPS und ^3H , ^{14}C -LPS)
- 2.3.2. Rattenkot nach Injektion von Präparat 4 und 5
- 2.4. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse der Kapitel 2.2. und 2.3.
- 2.5. Versuche zur Charakterisierung der radioaktiven Ausscheidungsprodukte: Dialyse von Urin und Kot
- 2.5.1. Dialyse von Meerkatzenurin
- 2.5.2. Dialyse von Rattenurin
- 2.5.3. Dialyse von Rattenkot
- 2.5.4. Untersuchung der flüchtigen radioaktiven Substanzen
- 2.5.5. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse von 2.5.
- 2.6. Untersuchungen zur Anreicherung und Charakterisierung der ausgeschiedenen radioaktiven Substanzen
- 2.6.1. Untersuchungen an Meerkatzenurin
- 2.6.1.1. Phenol/Wasser-Extraktion mit Meerkatzenurin
- 2.6.1.2. Äthanol-fällung mit Meerkatzenurin
- 2.6.1.3. Gelpermeationschromatographie mit Meerkatzenurin
- 2.6.1.4. Zusammenfassung der Versuche an Meerkatzenurin
- 2.6.2. Isolierung eines radioaktiven Präparates aus Rattenkot
- 2.6.2.1. Phenol/Wasser-Extraktion von Rattenkot
- 2.6.2.2. Phenolischer Aufschluß von ^{14}C -Rattenkot
- 2.6.2.3. Elektrodialyse von ^{14}C -Rattenkot
- 2.6.2.4. Phenol/Wasser-Extraktion mit den durch Elektrodialyse löslichen Präparaten
- 2.6.2.5. Protein- und Aminosackergehalt der aus Kot erhaltenen, löslichen Präparate

2.6.2.6.	Elektrodialyse von ^3H , ^{14}C -Rattenkot	74
2.6.2.7.	<u>Zusammenfassung von 2.6.2.</u>	75
2.6.3.	Gelpermeationschromatographie mit den löslichen Kotpräparaten	76
2.6.3.1.	Gelfiltration von löslichem ^{14}C -Rattenkotpräparat	77
2.6.3.2.	Gelfiltration von löslichem ^3H , ^{14}C -Rattenkotpräparat	79
2.6.3.3.	<u>Zusammenfassung und Diskussion der gelchromatographischen Ergebnisse</u>	79
2.6.4.	Weitere vorläufige Untersuchungen an den gereinigten Präparaten	81
2.6.4.1.	Erneute Gelfiltration der radioaktiven Peaks aus der SDS-Gelfiltration nach Entfernung von SDS	81
2.6.4.2.	Test auf O-Spezifität mit dem Säuleneluat aus 2.6.4.1.	81
2.6.4.3.	Erste Versuche, mittels Immunadsorption das radioaktive Präparat weiter anzureichern	84
2.6.4.3.1.	Isolierung der Anti- <u>S.abortus equi</u> -Antikörper und Herstellung der Immunsäule	84
2.6.4.3.2.	Immunadsorption mit dem radioaktiven Peak aus 2.6.4.1.	85
2.6.4.4.	<u>Zusammenfassung des Kapitels 2.6.4.</u>	85
C.	DISKUSSION	87
1.	Präparate und Tiere	87
2.	Die Ausscheidung in Urin und Kot	89
3.	Untersuchungen an den ausgeschiedenen Substanzen	91
3.1.	Untersuchungen des Urins	92
3.2.	Untersuchungen an Kot	96
3.3.	Der Verbleib des injizierten Lipopolysaccharides - Versuch einer Bilanz	97
4.	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit anderen Untersuchungen zum <u>in vivo</u> -Schicksal von Lipopolysaccharid	101

D. ZUSAMMENFASSUNG	104
E. MATERIAL UND METHODEN	106
1. Züchtung der Bakterien und Gewinnung von radioaktiv markiertem Lipopolysaccharid	106
1.1. Gewinnung von ^3H , ^{14}C -Lipopolysaccharid (Präparat 5)	106
2. Darstellung von Lipopolysaccharid-Derivaten	107
2.1. Milde saure Hydrolyse von Lipopolysaccharid zur Gewinnung von Lipoid A	107
2.2. Darstellung des fettsäurefreien Polysaccharides durch Hydrazinolyse (LPS-hydraz.)	107
2.3. Isolierung der Fettsäuren	107
2.3.1. Freisetzung der Fettsäuremethylester	107
2.3.2. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung von Fettsäuremethylestern	108
3. Beschreibung der Tierversuche	108
3.1. Experimente mit Meerkatzen	108
3.2. Experimente mit Ratten	109
4. Untersuchungen an Kot und Urin	109
4.1. Homogenisation von Kot	109
4.2. Dialyse im Dialyseschlauch	109
4.3. Membranfiltration	110
4.4. Phenol/Wasser-Extraktion	110
4.5. Phenolische Extraktion von Kot	110
4.6. Elektrodialyse von Kot und vorextrahierten Kotpräparaten	110
4.7. Gelpermeationschromatographie	111
4.7.1. Gele und Säulen	111
4.7.2. Puffer bei der Gelpermeationschromatographie	112
5. Der Aminosäureanalysator	112
6. Immunologische Verfahren	113
6.1. Test der passiven Hämolysehemmung	113
6.1.1. Antigene	113
6.1.2. Antiserum	113
6.1.3. Beladung der Erythrozyten mit LPS-OH	114
6.1.4. Meerschweinchenkomplement	114
6.1.5. Bestimmung der hämolytischen Einheit des Antiserums	114

6.1.6.	Empfindlichkeitskontrolle	115
6.1.7.	Bestimmung der passiven Hämolysehemmung	115
6.2.	Immunadsorption	115
6.2.1.	Herstellung der <u>S.abortus equi</u> -Immunsäule	115
6.2.1.1.	Aktivierung von AH-Sepharose 4B	115
6.2.1.2.	Kupplung von LPS-hydraz. an aktivierte AH-Sepharose 4B	116
6.2.2.	Isolierung von gereinigten Anti- <u>S.abortus equi</u> -Antikörpern	116
6.2.3.	Herstellung der Anti- <u>S.abortus equi</u> -Immunsäule	117
6.2.4.	Immunadsorption an Anti- <u>S.abortus equi</u> -Sepharose 4B	117
7.	Radioaktivitätsmessungen	118
7.1.	Verwendete Materialien und Geräte bei der Flüssigkeits- szintillationszählung	118
7.2.	Vorbereitung der Proben für die Szintillationszählung	119
7.2.1.	Wässrige Proben	119
7.2.2.	Urinproben	119
7.2.3.	Kotproben	119
7.2.3.1.	Oxidation der Proben mit Wasserstoffsuperoxid/Perchlorsäure	119
7.2.3.2.	Saure Hydrolyse und anschließende Oxidation der Proben	120
7.2.3.3.	Oxidation mit dem Probenverbrennungsgerät (Sample Oxidizer)	120

F. LITERATURVERZEICHNIS

122

Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

dOclA	3-Desoxy-oktulosonsäure
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure-natriumsalz
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
GlcN	Glukosamin, 2-Amino-2-desoxy- <u>D</u> -Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
LPS	Lipopolysaccharid aus <u>Salmonella abortus equi</u>
PBS	physiologischer Phosphat/Kochsalz-Puffer
PCP	Phenol/Chloroform/Petroläther
SDS	Natrium-lauroylsulfat
TEN	Triäthylamin(Triäthylammonium-)
Tris	Tris(hydroxyäthyl-)aminomethan

A. EINLEITUNG

Bakterielles Endotoxin ist seit über 80 Jahren bekannt. Bei Untersuchungen an Cholerabazillen stellte Pfeiffer (1892) fest, daß die Bakterien neben dem in das Medium ausgeschiedenen, bekannten Choleratoxin (Exotoxin) ein weiteres, mit den Bakterien eng verbundenes Gift besitzen, das er Endotoxin nannte.

Alle Gram-negativen Keime besitzen als charakteristischen Bestandteil ihrer äußeren Zellwand dieses Endotoxin (Nikaido und Nakae, 1979). Chemisch ist Endotoxin ein Lipopolysaccharid (Westphal et al., 1952a). Zusammen mit Protein und Phospholipiden bildet es die äußere Zellwand der Gram-negativen Bakterien. Diese ist asymmetrisch aufgebaut: Lipopolysaccharid und Protein bilden die äußere Phase der Doppelmembran, deren innere Schicht aus Phospholipiden, Proteinen und Lipoprotein aufgebaut ist (Nikaido und Nakae, 1979; Abb. I).

Durch seine exponierte Lage bestimmt das Polysaccharid zahlreiche Wechselwirkungen des Bakteriums mit anderen Organismen. Der Name O-Antigen für das Polysaccharid wurde von Weil und Felix (1918) eingeführt: Begeißelte Proteus-Bakterien bilden auf der Agarplatte einen Hauch, Antikörper gegen diese Keime sind gegen das Geißelantigen gerichtet, das man wegen des Hauches H-Antigen nannte. Nichtbegeißelte Proteus-Keime wachsen ohne Hauch, die Antikörper sind gegen das Polysaccharid des Lipopolysaccharides gerichtet, das man daher O-Antigen (ohne Hauch) nannte.

Die Identität von Endotoxin und O-Antigen wurde zuerst von Boivin et al. (1933) festgestellt. Später beschrieben Westphal und Lüderitz (1954), daß der Lipoidteil von Lipopolysaccharid, das sogenannte Lipoid A, allein für die endotoxischen Wirkungen verantwortlich sei, während das Polysaccharid keine endotoxischen Eigenschaften besitzt. Dies wurde später von mehreren

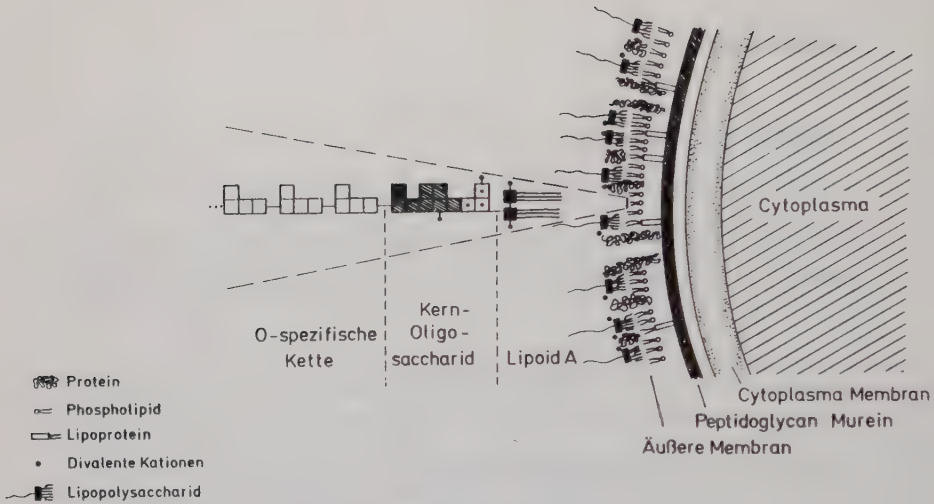


Abb. I. Der Aufbau der bakteriellen Zellwand und die Lage von Lipopolysaccharid (nach Nikaido und Nakae, 1979).

Autoren bestätigt (Kim und Watson, 1967; Lüderitz et al., 1966; Galanos et al., 1977 und 1977a).

Die endotoxischen Wirkungen von Lipopolysaccharid bzw. löslichem Lipid A zeigen sich im Organismus als pathophysiologische Ereignisse, wie Fieber oder Hypothermie, der Komplementinaktivierung, dem gefährdeten Schwartzmannphänomen, als Schock und Tod (Galanos et al., 1977a).

1. Die Struktur von Endotoxin

Alle bekannten Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien haben ein gemeinsames Strukturprinzip: Sie bestehen aus einer Polysaccharidkomponente und einem Lipoid-Teil, dem sogenannten Lipid A. Das Polysaccharid besteht aus zwei funktionell und strukturell unterschiedlichen Teilen, der O-spezifischen Kette und dem Kernoligosaccharid (Lüderitz et al., 1966).

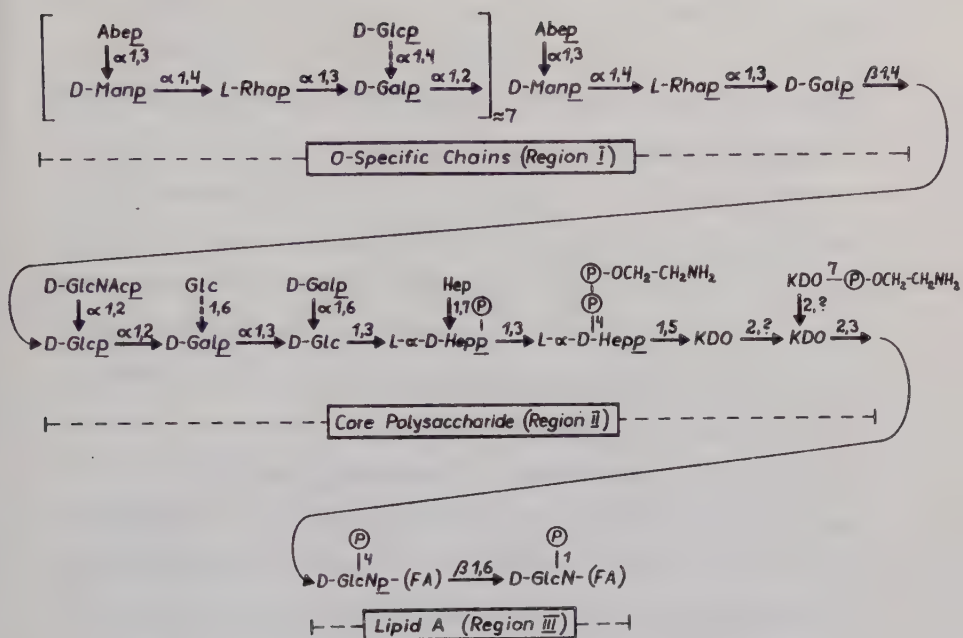


Abb. II. Das Strukturprinzip von Endotoxin (am Beispiel von Lipopolysaccharid aus *Salmonella abortus equi*, nach Galanos et al., 1979)

Eingehend untersucht wurde dieses endotoxische Strukturprinzip zuerst an Salmonellen; es wurde aber bei vielen anderen Gram-negativen Keimen bestätigt (Abb. II.).

Bestimmte Mutationen im Genom der Bakterien, die während des Wachstums spontan auftreten, aber auch durch Mutagene oder ionisierende Strahlung induziert werden können, blockieren die Biosynthese des Polysaccharides (Lüderitz et al., 1966). Es wird nun ein unvollständiges Lipopolysaccharid

gebildet. Anhand der Kolonieförmigkeiten auf Agarplatten unterscheidet man zwischen dem glatten Wildtyp (engl.: smooth, S-Form) und den rauen Mutanten (engl.: rough, R-Form) mit defekter Polysaccharid-Biosynthese (Beckmann et al., 1964).

Die R-Mutation führt zu Veränderungen in der äußeren Zellwand der Bakterien: In Salmonella minnesota R595 (R_e -Mutation, vergl. 1.2.) ist die asymmetrische Verteilung von Lipopolysaccharid und Phospholipid auf die beiden Phasen der äußeren Zellwand (vergl. Seite 1) aufgehoben, Phospholipide finden sich auch in der äußeren Phase. Der Proteingehalt ist deutlich reduziert (Nikaido und Nakae, 1979).

Die Anwesenheit einer, wenn auch minimalen Lipopolysaccharid-Komponente in der äußeren Zellwand ist für die Bakterien lebensnotwendig: Mutationen mit defekter Lipoid A-Biosynthese oder einem völlig fehlenden Polysaccharid sind nicht vermehrungs- oder lebensfähig (Nikaido, 1973).

1.1. Die O-spezifische Kette

Die O-spezifische Kette ist das Strukturelement, in dem die große Vielfalt der bakteriellen Serotypen chemisch verankert ist. Für Salmonella-Spezies konnten Kauffmann und White durch serologische Kreuzreaktionen zeigen, daß es sich bei den über tausend Serotypen um Kombinationen verschiedener Antigenfaktoren handelt. Sie stellten anhand der etwa 70 bisher bekannten Faktoren das nach ihnen benannte Kauffmann/White-Schema der Salmonellen auf (Kauffmann, 1972).

Die serologisch gefundenen Antigenfaktoren konnten als chemisch definierte, determinante Gruppen identifiziert werden (Lüderitz et al., 1966). Dabei wurden bei Salmonellen einige Zuckerbausteine zum ersten Mal entdeckt, z.B.

Didesoxyhexosen wie Tyvelose (aus S.typhi), Abequose (aus S.abortus equi) (Fromme et al., 1957).

Charakteristisch für alle O-spezifischen Polysaccharidketten ist der Aufbau aus sich wiederholenden Untereinheiten identischer Oligosaccharide (Lüderitz et al., 1966; Westphal, 1975).

Die Anwesenheit von O-Polysaccharid bewirkt die große Festigkeit der äußeren Zellwand. Die Diffusion innerhalb der Membran ist stark eingeschränkt. Die Hydrophilie der Membran wird durch O-spezifische Ketten stark erhöht, so daß hydrophobe Substanzen wie die Antibiotika Actinomycin D, Novobiocin oder Rifamycin SV, Kristallviolett (Farbstoff der Gram-Färbung) oder Fettsäuren am Eindringen in das Bakterium gehindert werden. Die rauhen Mutanten (R_d und R_e , s. unten) sind gegen diese Substanzen viel schlechter geschützt. Außerdem verhindert die O-spezifische Kette die Phagozytose durch den Wirtsorganismus, wenn diesem die spezifischen Antikörper fehlen. Der Immunantwort des Wirtes können sich die Bakterien überdies durch phageninduzierte Veränderung der O-Spezifität entziehen (Nikaido und Nakae, 1979; Nikaido, 1973).

1.2. Das Kernoligosaccharid

Im Gegensatz zu der großen Variabilität in der O-spezifischen Kette sind die inneren Lipopolysaccharidregionen weniger variabel. Das auf das O-Polysaccharid nach innen folgende Kernoligosaccharid weist nur noch wenig Heterogenität auf: Für alle Salmonella-Spezies ist bis jetzt nur ein gemeinsamer Kern beschrieben, für die übrigen Enterobacteriaceae wurden bislang fünf andere Kerntypen gefunden (Abb. III.). Allen gemeinsam ist der Aufbau aus innerem und äußerem Kern: Der innere Kern besteht aus Desoxyoktulosensäure (dOcIA, frühere Bezeichnung KDO) und Heptose sowie Phosphat- und

Äthanolaminphosphat-Substituenten. Über dOcIA ist das Polysaccharid an Lipid A gebunden. Der äußere Kern wird von einem Pentasaccharid aus Glukose (Glc), Galaktose (Gal) und 2-Deoxy-2-aminoglukose (Glukosamin, GlcN) gebildet (Rietschel und Lüderitz, 1980).

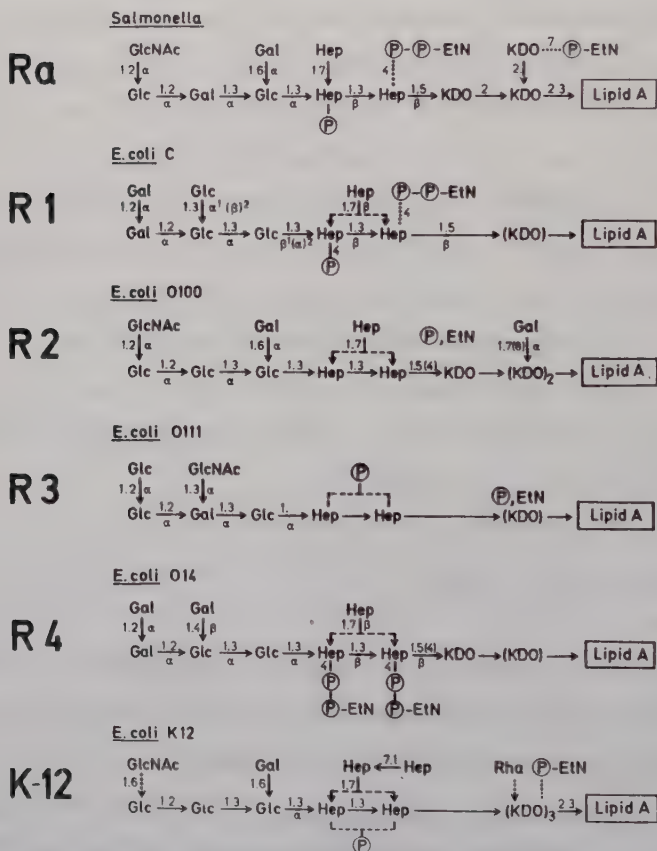


Abb. III. Kernoligosaccharidstrukturen bei Enterobacteriaceae (nach Rietschel et al., im Druck)

Die Struktur des Kernoligosaccharides der Salmonella-Arten wurde mit Hilfe von R-Mutanten ermittelt. Durch Analyse der Zusammensetzung von Lipopolysacchariden der Mutanten (Abb. IV.) konnten der Aufbau des Kerns sowie die einzelnen Schritte der Kernbiosynthese erforscht werden (Lüderitz et al., 1966; Galanos et al., 1977).

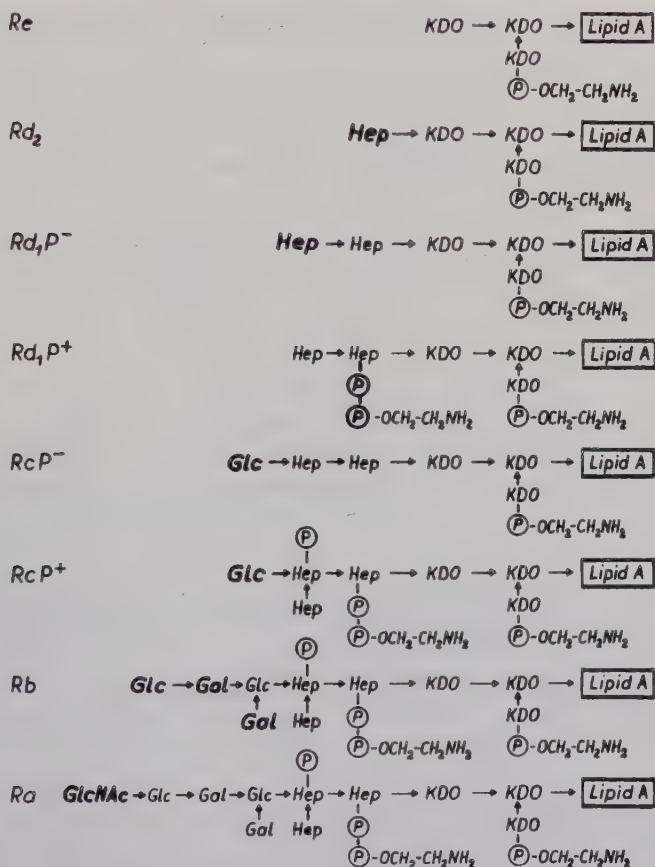


Abb. IV. Lipopolysaccharidstrukturen kerndefekter Salmonella-R-Mutanten (nach Lüderitz et al., 1966)

1.3. Das Lipoid A

Lipoid A ist die am wenigsten variable Region von Lipopolysaccharid. Für alle Enterobacteriaceae und viele andere Gram-negative Keime wurde bis jetzt eine gemeinsame Lipoid A-Grundstruktur ermittelt (Galanos et al., 1977).

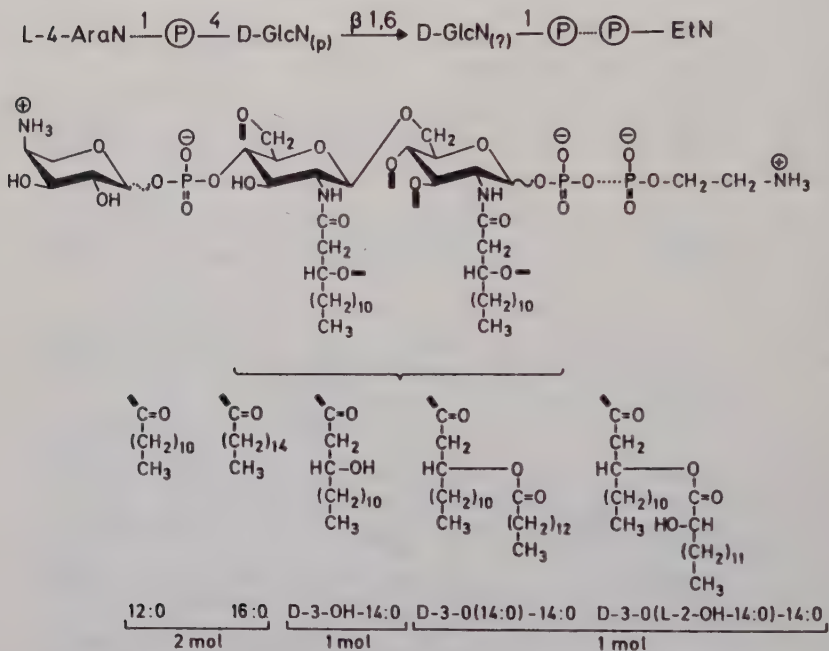


Abb. V. Die Struktur von Lipoid A aus Salmonella (nach Rietschel et al., im Druck)

Dabei handelt es sich um ein Glucosamindisaccharid mit β-1',6-Verknüpfung, dessen 1- und 4'-C-Atome mit Phosphat substituiert sind. Die Aminogruppen tragen D-3-Hydroxy-myristinsäurereste. Am C-Atom 3' ist das Polysaccharid über dOcIa an Lipoid A ketosidisch gebunden. Die übrigen Hydroxylgruppen an den C-Atomen 3,4 und 6' sind mit langkettigen Fettsäuren (Laurin-,

Myristin- und Palmitinsäureresten), mit D-3-Hydroxy-myristinsäure und acylierter D-3-Hydroxy-myristinsäure verestert. Diese gemeinsame Struktur variiert in den Phosphatsubstituenten: Bekannt sind anstelle von Phosphat Pyrophosphat, Äthanolaminpyrophosphat, Glukosylphosphat und 4-Amino-ara-binosylphosphat (Galanos et al., 1977; Abb. V.).

Die besondere Struktur von Lipoid A der Enterobacteriaceen ist für die endotoxischen Wirkungen verantwortlich (Tabelle 1.). Lipoid A von anderen Bakterienfamilien, das sich chemisch von Lipoid A der Enterobacteriaceae unterscheidet, hat eine geringere oder keine endotoxische Aktivität (Galanos et al., 1977).

Tabelle 1. Die biologischen Eigenschaften von freiem Lipoid A (nach Galanos et al., 1977)

Pyrogenicity	Induction of nonspecific Resistance to Infection
Lethal Toxicity in Mice	Induction of Tolerance to Endotoxin
Leucopenia	Induction of early refractory State to Temperature Change
Leucocytosis	Adjuvance Activity
Local Schwartzman Reaction	Mitogenic Activity for Cells
Bone Marrow Necrosis	Tumor necrotic Activity
Embryonic Bone Resorption	Macrophage Activation
Complement Activation	Induction of colony Stimulating Factor
Depression of Blood Pressure	Induction of IgG Synthesis in newborn Mice
Platelet Aggregation	Induction of Prostaglandin Synthesis
Hageman Factor Activation	Induction of Interferon Production
Induction of Plasminogen Activator	Induction of Tumor-necrotizing Factor
Limulus Lysate Gelation	Induction of Mouse Liver Pyruvate Kinase
Toxicity enhanced by BCG	Type C RNA Virus Release from Mouse Spleen Cells
Toxicity enhanced by Adrenalectomy	Helper Activity for Friend Spleen Focus-forming Virus in Mice
Enhanced dermal Reactivity to Epinephrine	Inhibition of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
	Hypothermia in Mice

Die kleinste endotoxisch wirksame Einheit versuchte man durch gezielte Abspaltung einzelner Substituenten des Lipoid A wie Phosphat oder Fettsäuren zu identifizieren. Heute weiß man, daß intaktes Lipoid A die höchste Aktivität besitzt. Schwache alkalische Hydrolyse, bei der die ester-gebundenen Fettsäuregruppen abgespalten werden, verringert die endotoxische Wirksamkeit um das hundert- bis tausendfache (Rietschel, persönliche Mitteilung). Hydrazinolyse, bei der alle Fettsäure- und Phosphatreste abgespalten werden, führt zu einem nichttoxischen Disaccharid und entsprechend bei Lipopolysaccharid zu einem nichttoxischen Polysaccharid (Malchow et al., 1967; Jay, 1978; Jay und Galanos, in Vorbereitung).

2. Extraktion und Isolierung von Lipopolysaccharid von der Bakterienoberfläche.

Die unterschiedliche Reinheit endotoxischer Präparate ließ lange Zeit keine Aussagen über die tatsächliche Zusammensetzung des endotoxischen Komplexes zu. Erst in den fünfziger Jahren wurde das bis dahin unbekannte und in der Natur sonst beispiellose Strukturprinzip erkannt, da mit der Phenol/Wasser-Extraktion der Weg zu einer Isolierung von reinem Lipopolysaccharid von der Bakterienoberfläche gefunden worden war.

Als erster hatte Centanni (1894) durch Kochen der Keime und Fällung des Kulturüberstandes mit Äthanol ein endotoxisches Präparat gewonnen, das er durch Suspension in Wasser und wiederholte Äthanolfällung weiter reinigte.

Einen bedeutenden Schritt machten Boivin und Mitarbeiter, die auf der Suche nach dem O-Antigen Gram-negativer Keime die Bakterien mit Trichloressigsäure (TCA) extrahierten und das Polysaccharidantigen in einem Komplex mit Lipoid und Protein fanden (Boivin und Mesrobian, 1933). Zu ihrer Überraschung hatte dieser Komplex endotoxische Aktivität (Boivin et al., 1933; Boivin, 1946). In späteren Arbeiten beschreiben sie, daß der endotoxische

Komplex nur aus Polysaccharid und Lipoid gebildet wird und kein Protein enthält (Boivin et Mesrobeanu, 1935). Die TCA-Extrakte besitzen eine hohe endotoxische Aktivität (Boivin und Mesrobeanu, 1936), mit ihnen kann man in Mäusen und Kaninchen eine starke Immunantwort gegen die Bakterien hervorrufen (Boivin und Mesrobeanu, 1937).

Zur chemischen Analyse des Endotoxins gelangte man, als Westphal und Mitarbeiter (1952) die Phenol/Wasser-Methode einführten. Dabei werden die abgetöteten Keime in einer Mischung gleicher Teile von Wasser und 90% Phenol suspendiert. Unter 65°C hat dieses Gemisch bei Normaldruck eine Mischungslücke und liegt in zwei Phasen vor. Über 65°C ist das Gemisch homogen. Der gemeinsame Angriff von Wasser und hydrophobem Phenol zwischen 68° und 70°C löst Lipopolysaccharid von der Zellwand ab. Proteine verbleiben zum größten Teil beim Abkühlen auf 0°C in der phenolischen Phase. Lipopolysaccharid wird in der wässrigen Phase wiedergefunden. Durch Ultrazentrifugation läßt sich das Lipopolysaccharid von löslichen Polysacchariden wie Glukanen oder Galaktanen, von wasserlöslichen Proteinen und von Ribonukleinsäuren befreien.

Mit diesem Verfahren wurden bis heute Endotoxine zahlreicher Gram-negativer Keime isoliert.

Bei einigen Stämmen versagt die Phenol/Wasser-Methode. Bei diesen Stämmen handelt es sich um die schon erwähnten Rauhmутanten. Deren Lipopolysaccharid wurde nicht in der wässrigen, sondern in der phenolischen Phase wiedergefunden. Zur Extraktion der rauen Lipopolysaccharide wurde das Phenol/Chloroform/Petroläther-Verfahren (PCP) entwickelt, bei dem das raue Lipopolysaccharid bei 40°C durch das PCP-Gemisch in Suspension gebracht wird. Nach Abdampfen von Chloroform und Petroläther wird das Lipopolysaccharid aus der phenolischen Lösung durch Zugabe von Wasser

ausgefällt (Galanos et al., 1969).

Es stellte sich heraus, daß einige glatte, nach der Phenol/Wasser-Methode vor-extrahierte Lipopolysaccharide mit dem PCP-Verfahren weiter gereinigt werden können, obwohl glatte Lipopolysaccharide mit der PCP-Methode nicht von der Bakterienoberfläche isoliert werden können (Galanos et al., 1977 und 1979). Dadurch kann man durch wenige Isolierungsschritte praktisch proteinfreie Lipopolysaccharidpräparate gewinnen.

3. Physikochemische Eigenschaften von Lipopolysaccharid.

In Lipopolysaccharid sind hydrophile und hydrophobe Strukturen gleichermaßen enthalten. Substanzen mit ähnlich amphipatischem Aufbau sind Seifen (Fettsäuresalze) oder Phospholipide. Solche Moleküle liegen in wässriger Lösung nicht monomolekular vor, sondern bilden hochmolekulare Aggregate in Form von Mizellen, in denen die wasserabstoßenden Strukturelemente in das Innere, die wasserlöslichen nach außen, dem wässrigen Medium zu, gerichtet sind (Tanford, 1980). Die Größe der Mizellen bei Phospholipiden hängt von deren Konzentration in Lösung ab. Bei Lipopolysaccharid wurde eine Pufferabhängigkeit gefunden. Skarnes und Chedid (1964) haben gefunden, daß die Zugabe von Citrat zum Puffer bei der Immunpräzipitation in Agarose nach Ouchterlony zu erhöhter Diffusionsgeschwindigkeit des Endotoxins führt. Man kann annehmen, daß das Citrat-Anion Kationen komplexiert, die in Lipopolysaccharid die sauren Phosphat- und Carboxylgruppen neutralisieren, und daß dadurch die Mizellen verkleinert werden. Daß diese Kationen tatsächlich für die Mizellgröße verantwortlich sind, konnten Galanos und Lüderitz (1975) zeigen, die durch Elektrodialyse alle Kationen vom Lipopolysaccharid entfernten und durch Neutralisation des sauren Lipopolysaccharids mit einzelnen

Basen definierte, einheitliche Salzformen von Lipopolysaccharid herstellen. Durch Ultrazentrifugation wurden die Sedimentationskoeffizienten der verschiedenen Salzformen bestimmt, die ein Maß für den Aggregationszustand und damit für die Mizellgröße darstellen.

Es zeigte sich, daß große Unterschiede im Aggregationszustand der einzelnen Salzformen bestehen. Die ungefähre Molmasse der Mizellen läßt sich aus dem Sedimentationskoeffizient berechnen: für die Triäthylammoniumform (TEN-Form) von Salmonella abortus equi mit einem Sedimentationskoeffizienten von 9,3 (S) ein Molekulargewicht von 400 000 (D), für die Natriumform (Na-Form) mit 105 (S) (beide Werte bei einer Konzentration von 0,8%) ein Molekulargewicht von etwa 11×10^6 (D). Unter der Annahme einer Molmasse von 20 000 (D) für das Lipopolysaccharidmolekül (Malchow et al., 1969; Romeo et al., 1970; Kasai et al., 1970; Galanos, 1975) besteht die Mizelle aus 20 Molekülen (TEN-Form), bzw. aus 550 (Na-Form). Zweiwertige Ionen wie Ca^{++} oder Mg^{++} machen Lipopolysaccharid schwerlöslich, weil sie durch ionische Quervernetzung zu einem sehr hohen Aggregationszustand führen. Dies gilt in noch stärkerem Maße für dreifachgeladene Kationen wie Fe^{3+} .

Die verschiedenen Verfahren, Lipopolysaccharid von der Bakterienoberfläche zu isolieren, führten früher zu Präparaten, die im Tierversuch unterschiedliche und widersprüchliche Ergebnisse brachten. Mit den einheitlichen Salzformen von Lipopolysaccharid zeigten Galanos et al. (1979a), daß diese Unstimmigkeiten auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Salzformen von Lipopolysaccharid zurückgeführt werden können. In Tabelle 2. sind solche Untersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 2. Sedimentationskoeffizienten verschiedener einheitlicher Salzformen von Lipopolysaccharid aus S. abortus equi und einige biologische Eigenschaften in Abhängigkeit von der Salzform (nach Galanos et al., 1979a).

<u>S. abortus equi</u> LPS	Sedimentation Coefficient	Solubility (Water)	Lethal Toxicity Mice Rats	Pyrogenicity (Rabbits)	Rate of clearance from the blood	Interaction with C' in vivo and in vitro	Affinity for cells	Mitogenic activity	Limulus lyzate gelation
Triethylamine (TEN)	93	↑	↑	↑			(a)	↑ (b)	↑ (b)
Pyridine									
Ethanolamine									
Na									
K									
Putrescine	230								
Ca	partly insol		↓		↓	↓	↓	↓	↓

Arrows show direction of increasing activity

(a) In the TEN form S form LPS is completely non-anticomplementary

(b) No difference within the above range of (S) values.

4. Die Wirkung von Endotoxin im Organismus

Gram-negative Bakterien bilden einen wesentlichen Teil der Darmflora von Säugetieren und Menschen. Damit ist die Anwesenheit von Endotoxin im Darm der Normalfall als Folge des symbiotischen Zusammenlebens von Säugetier und Bakterium. Kleine Mengen von Endotoxin, so nimmt man an, gelangen dauernd durch die Darmwand in die Zirkulation (Galanos et al., 1978). Solch geringe Mengen scheinen für den Organismus nützliche Eigenschaften zu haben: Lipopolysaccharid stimuliert allgemein die Immunkräfte

des Organismus, indem es u.a. die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten zur Teilung anregt (Galanos et al., 1977). Lipopolysaccharid ist auch als Adjuvanz wirksam (Neter, 1969; Andreesen, 1974). Man vermutet, daß Endotoxin an regulatorischen Vorgängen im Organismus beteiligt ist (Galanos et al., 1978).

Dennoch ist Endotoxin für viele Tiere und den Menschen ein starkes Gift (Galanos et al., 1977). Für einige Arten wurden letale Dosen bestimmt; dabei bestehen große Unterschiede zwischen einzelnen Spezies. So sind z.B. Primaten, andere Affenarten und Ratten sehr viel weniger Lipopolysaccharid-empfindlich als Kaninchen, Pferde, Hunde oder Menschen (Westphal, 1975; Sultzter, 1972).

Die Virulenz der Bakterien scheint nicht von der Lipopolysaccharid-Komponente abzuhängen. Vergleicht man die sehr verwandten Keime von Salmonella typhi und Salmonella typhimurium, so ist der erstere nur im Menschen, der letztere nur in der Maus letal. Die isolierten Lipopolysaccharide von beiden Keimen sind aber in Mensch und Maus gleich toxisch. Wesentlich für die Virulenz dieser Enterobakterien scheint nicht die Toxizität des Endotoxins zu sein, sondern die Fähigkeit, sich an die Darmwand anheften zu können. Ähnliches gilt auch für die weitverbreiteten E.coli-Bakterien, bei denen die Stämme K88 und K99 aufgrund von Pili, die bei K88⁻ und K99⁻-Stämmen nicht gefunden wurden, imstande sind, sich an das Darmepithel anzulagern, und dadurch auch menschenpathogen werden (Jones, 1975).

Ob Lipopolysaccharid im endotoxischen Geschehen direkt eingreift, ist wenigstens für einige endotoxischen Aktivitäten verneint worden. Durch die Entdeckung von "endogenem Pyrogen" aus Granulozyten (Dinarelli et al., 1974) und von Prostaglandinen aus Makrophagen (Feldberg, 1975) wurde bewiesen, daß das Endotoxin-Fieber durch diese endogenen Mediatoren vermittelt wird.

Bei der Aufklärung des endotoxischen Mechanismus steht man noch immer am Anfang. Dies liegt einerseits in der Natur von Endotoxin, da es schon in sehr kleinen, praktisch nicht wiederzufindenden Mengen* physiologisch wirksam ist. Dadurch wurden genaue in vivo- und in vitro-Versuche erschwert. Zum anderen reagiert der Organismus mit einer Vielzahl von Veränderungen auf Endotoxin, deren gegenseitige Abhängigkeiten noch nicht vollkommen verstanden werden.

Einzelne Mäuseinzuchtstämme zeigen gegenüber verwandten Stämmen eine einzelne Mutation in einem Lps-Gen auf dem Chromosom 4. Sowohl der Stamm C3H/HeJ als auch der Stamm C57Bl/10Cr zeigen sich unempfindlich gegenüber Lipopolysaccharid, im Gegensatz zu den Lipopolysaccharid-empfindlichen, kongenen C3H/HeN- bzw. C57Bl/10Sn-Mäusen (Watson et al., 1978; Coutinho und Meo, 1978). Aus dem Vergleich der physiologischen Reaktionen der unempfindlichen Tiere mit denen der empfindlichen hofft man, das Geschehen nach Endotoxin-Injektion besser verstehen zu können.

Die Empfindlichkeit von Mäusen gegenüber Endotoxin kann durch Herausoperieren der Nebenniere (Chedid und Parant, 1961), durch Bleiacetat (Selye et al., 1966) und Galaktosamingabe (Galanos et al., 1979b) um das zehntausend- bis hunderttausendfache steigern. Solchermaßen empfindlich gemachte Mäuse dienen u.a. zur Bestimmung von Endotoxin in biologischen Gemischen wie z.B. Blut, Serum oder Urin.

* Die empfindlichsten Untersuchungsmethoden für Endotoxin sind:

- a) in vivo:
 - 1. Lethalität empfindlichgemachter Mäuse (siehe oben),
 - 2. Pyrogenität im Kaninchen; Grenzbereich von 0,1-1 ng/kg Körpergewicht,
- b) in vitro:
 - 1. für alle endotoxischen Lipopolysaccharide:
Limulus-Lysat-Gelierungs-Test; Grenzwert bei 1-10 pg/ml.
 - 2. für ein spezielles Lipopolysaccharid mit definierter O-Spezifität:
Hämolyse- und Hämagglutinationshemmtest; Grenzwert bei 20 ng/ml.

5. Das Schicksal von Endotoxin im tierischen Organismus

Nur sehr wenig ist bisher darüber bekannt, wie der tierische Organismus Endotoxin biochemisch oder enzymatisch entgiftet. Man kennt heute die Organe, von denen Lipopolysaccharid nach intravenöser Injektion aufgenommen wird. Es sind vor allem Leber und Milz, zum kleineren Teil auch Niere, Lunge, Nebenniere, Muskeln und Darm (Braude et al., 1955; Zlydaszyk und Moon, 1976; Mathison und Ulevitch, 1979; M.A. Freudenberg, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von radioaktiven Lipopolysaccharidpräparaten erzielt, die entweder durch Komplexierung von Endotoxin mit ^{51}Cr - Chromat (Braude et al., 1955a), durch Einbau von Isotopen in das Lipopolysaccharid während des Wachstums der Bakterien (intrinsische Markierung, z.B. Bona, 1973; Lehmann et al., 1977) oder durch chemische Kupplung eines aromatischen Ringes an Lipopolysaccharid und dessen anschließende Jodierung (Ulevitch, 1978; Gutowski und Jacobs, 1979) hergestellt wurden.

Einige Arbeiten in der Literatur befassen sich mit der in vitro-Detoxifikation von Endotoxin durch Serumkomponenten wie β -Lipoprotein und α_1 -Globulin (Skarries, 1966).

Ein enzymatischer Endotoxinabbau ist bislang nur von niederen Organismen beschrieben: Der phagozytierende Schleimpilz Dictyostelium discoideum, gezüchtet auf Gram-negativen Bakterien als einziger Nahrungsquelle, baut deren Lipopolysaccharid zu dem entsprechenden fettsäurefreien Polysaccharid ab, welches keine endotoxische Aktivität mehr besitzt. Wie Malchow et al. (1967 und 1969) zeigen konnten, sind von dem Lipopolysaccharid nur die Fettsäuren abgespalten worden. Auch Physarum polycephalum, ebenfalls ein Schleimpilz, ist zur Abspaltung von Fettsäuren aus Lipopolysaccharid befähigt (Saddler et al., 1979). Ebenso wird beschrieben,

daß die Schnecke Helix pomatia ebenfalls zu einem in vivo-Abbau von Lipopolysaccharid befähigt ist (Saddler et al., 1979a).

In jüngster Zeit wurde beschrieben, daß Lipopolysaccharid im Serum mit High-density-Lipoprotein (HDL) komplexiert (Weinstein und Ulevitch, 1978; Freudenberg et al., 1980). Freudenberg et al. identifizierten den HDL-Lipopolysaccharid-Komplex auch nach Lipopolysaccharidinjektion in vivo. Außerdem wurde das Lipopolysaccharid in den Makrophagen der Leber wiedergefunden (Freudenberg und Galanos, in Vorbereitung).

Den Versuchen, enzymatisch modifiziertes Endotoxin zu reisolieren, stehen ähnliche Schwierigkeiten gegenüber, wie sie auch der Aufklärung endotoxischer Vorgänge entgegenstehen. Es ist vor allem die hohe Wirksamkeit geringster Endotoxinmengen, die Versuche verhindert, bei denen größere Mengen an Endotoxin oder seiner Metabolite reisoliert werden können. Werden aber größere Mengen an Endotoxin injiziert, so sterben empfindliche Tiere nach kurzer Zeit am Endotoxin-Schock.

6. Ziele und Aufgaben für die vorliegende Arbeit

Die bisherigen Untersuchungen über das Schicksal von Lipopolysaccharid in vivo sind noch sehr unvollständig. Es entstand deshalb der Plan, wohldefinierte, intrinsisch markierte Lipopolysaccharid-Präparate in Tiere zu injizieren und zu versuchen, sowohl Ausscheidungswege von Lipopolysaccharid aus dem Organismus zu definieren, als auch aus den Ausscheidungsorganen und den ausgeschiedenen Produkten Rückschlüsse auf das in vivo-Geschehen zu ziehen. Die ersten Tiere, die untersucht werden sollten, waren die Lipopolysaccharid-unempfindlichen Meerkatzen (Vervets) und Ratten, denen man zwischen 5 und 10 mg Lipopolysaccharid je kg Körpergewicht injizieren kann. Die Möglichkeit, hohe Dosen an Lipopolysaccharid zu injizieren, kam dem

Wunsch entgegen, größere Mengen an radioaktiven Präparaten einzuspritzen, denn die bisher gewonnenen, intrinsisch markierten Präparate sind - vor allem aus methodischen Gründen - nur relativ schwach markiert. Es sollte untersucht werden, ob die Unempfindlichkeit der Tiere auf enzymatischen Detoxifizierungsmechanismen beruht, z.B. Abspaltung der Fettsäuren, auf physikalischen Veränderungen am Lipopolysaccharidmolekül, wie Bindung und Maskierung des Lipoid A mit Anti-Lipoid A-Antikörpern oder Veränderung des Aggregationszustandes, z.B. durch HDL. Weiterhin sollte versucht werden, Lipopolysaccharid oder Stoffwechselprodukte von Lipopolysaccharid aus den Ausscheidungsprodukten in gereinigter Form zurückzugewinnen.

B. Experimenteller Teil

1. Züchtung der Bakterien; Isolierung und Charakterisierung von Lipopoly saccharidpräparaten

Das Lipopolysaccharid aus Salmonella abortus equi (LPS*) wird seit langem für zahlreiche biologische in vivo- und in vitro-Versuche benutzt. Von diesem LPS wurden Präparate gewonnen, die völlig frei sind von Protein- und Nukleinsäureverunreinigungen. Langjährige biologische Untersuchungen an Mensch und Tier mit diesem LPS sowie die genaue Charakterisierung seiner chemischen und physikochemischen Eigenschaften veranlaßten, daß dieses LPS für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche ausgewählt wurde.

1.1. Darstellung von nichtmarkiertem Lipopolysaccharid

S.abortus equi-Bakterien (Stamm 1301) wurden nach Schlecht et al. (1968) im 80 ltr-Fermenter gezüchtet. Beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wurden die Bakterien durch Zugabe von Phenol abgetötet. Die getrockneten Bakterien wurden nach der Phenol/Wasser-Methode (Westphal et al., 1952a) extrahiert. Der wasserlösliche Extrakt wurde nach dem Phenol/Chloroform/Petroläther-Verfahren (Galanos et al., 1969) weitergereinigt. Anschließend wurde durch Elektrodialyse das saure LPS ($\text{LPS}(\text{H}^+)$) gewonnen, das nach Neutralisation mit Triäthylamin als Triäthylammonium-Salz erhalten wird ($\text{LPS}(\text{TEN})$). Geringe Anteile an R-Form-Lipopolysacchariden - mit denen S-Form-Lipopolysaccharide üblicherweise kontaminiert sind - wurden durch Zugabe von Calciumchlorid zur $\text{LPS}(\text{TEN})$ -Lösung ausgefällt. Nach

* Die Abkürzung LPS wird in dieser Arbeit nur für Lipopolysaccharid aus S.abortus equi benutzt.

erneuter Elektrodialyse, Neutralisation mit Natriumhydroxid und anschließender PCP-Extraktion lag ein LPS-Präparat (Na-Salz) vor, dessen Analyse zeigt, daß sich die Komponenten zu 100% addieren (nach Galanos et al., 1979; vgl. Tabelle 3.).

Tabelle 3. Die Zusammensetzung von *S.abortus equi*-Lipopolysaccharid (Na-Form) (nach Galanos et al., 1979)

Zucker ⁺⁾	%	Fettsäuren ⁺⁾	%	andere Bestandteile	%
D-Abequose	13.5	Laurinsäure (C12)	2.2	Phosphat ⁺⁾	5.0
L-Rhamnose	15.2	Myristinsäure (C14)	1.8	Natrium	1.8
D-Mannose	15.7	D-3-Hydroxy-myristinsäure (3-OH-C14)	5.6	4-Amino- α -arabinose	0.3
D-Heptose	5.0	Palmitinsäure (C16)	1.1	Äthanolamin	0.2
D-Galaktose	17.8				
D-Glukose	4.0				
Desoxyoktuloson-säure (dOcIA)	6.8				
D-Glukosamin	4.2				
Total	82.2		10.7		7.3
Total: approx. 100 %					

⁺⁾ als Anhydrorest berechnet.

1.2. Darstellung von radiomarkiertem ^3H , ^{14}C -Lipopolysaccharid

In Gegenwart von D-(^{14}C (U))-Glukose*, N-Acetyl-D-(1- ^{14}C)glukosamin und (^3H)-Natriumacetat wurden *S.abortus equi*-Bakterien (Stamm 1301) in vier 1 ltr- Schüttelkulturen (Standard I-Medium, 37°C) gezüchtet. Nach 10 Stunden wurden je 20 ml 90% Phenol zugesetzt. Die abgetöteten Bakterien wurden

* (U) bedeutet ubiquitär, alle C-Atome sind markiert.

getrocknet (1,92 g) und anschließend mit Phenol/Wasser extrahiert. Der Extrakt (263 mg) wurde nach der PCP-Methode (Galanos et al., 1969) weitergereinigt und der PCP-Extrakt (32 mg) elektrodialysiert. Das saure LPS (28 mg) wurde in die Natriumform überführt (^3H , ^{14}C -LPS (Na-Form)). Nach Verbrennung von ^3H , ^{14}C -LPS im Probenverbrennungsgerät wurden die ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten getrennt bestimmt. Die spezifische Aktivität ist für ^3H $1,51 \times 10^5$, für ^{14}C $1,34 \times 10^6$ CpM pro mg LPS (Tabelle 4.).

Tabelle 4. Einbau der Isotope in das isolierte ^3H , ^{14}C -LPS

Substrat	im Kulturmedium		in LPS eingebaut		
	Isotop	CpM ($\times 10^{-6}$)	CpM/mg ($\times 10^{-6}$)	CpM in 28 mg LPS (H^+) ($\times 10^{-6}$)	% der angebotenen Aktivität
Glukose	^{14}C	250			
N-Acetyl- glukosamin	^{14}C	500	1,34	37,4	5,0
Natrium- acetat	^3H	5000	0,151	4,23	0,084
Isotopenverhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ in ^3H , ^{14}C -Lipopolysaccharid aus <u>S.abortus equi</u> : 7,3					

In entsprechender Weise wurden einfachmarkierte LPS Präparate dargestellt.

Es wurden in den Tierversuchen folgende Präparate benutzt:

- Präparat 1** nicht markiertes S.abortus equi LPS (vgl. 8.1.1)
- Präparat 2** ^{14}C -LPS, $5,8 \times 10^3$ ^{14}C -CpM/mg, ^{14}C aus Glukose
- Präparat 3** ^3H -LPS, 3×10^3 ^3H -CpM/mg, ^3H aus Natriumacetat
- Präparat 4** ^{14}C -LPS, $4,3 \times 10^5$ ^{14}C -CpM/mg, ^{14}C aus N-Acetylglukosamin
- Präparat 5** ^3H , ^{14}C -LPS (siehe Tabelle 4.)

1.3. Charakterisierung des ^3H , ^{14}C -LPS-Präparates

1.3.1. Schwach saure Hydrolyse von ^3H , ^{14}C -LPS

Nach Hydrolyse von LPS (Präparat 1 (6,7 mg) und Präparat 5 (0,5 mg)) in 0,1 N Salzsäure (2 ml; 40 min, 100°C) wurde der abzentrifugierte Niederschlag (Lipoid A) in Wasser (0,5 ml) mit 1 Tropfen Triäthylamin suspendiert. Davon wurden 3 x 100 µl im Probenverbrennungsgerät verbrannt. Auch vom Überstand der Hydrolyse wurden nach Neutralisation mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (300 µl) drei 100 µl Proben verbrannt. In der Lipoid A-Suspension wurden $1,55 \times 10^5$ ^3H -CpM und $1,04 \times 10^6$ ^{14}C -CpM, in der Polysaccharid-Lösung $7,2 \times 10^3$ ^3H - und $1,43 \times 10^5$ ^{14}C -CpM bestimmt. Das Isotopenverhältnis beträgt in Lipoid A 6,72 und in der Polysaccharidlösung 19,8. Von der eingesetzten Aktivität wurden 90% (^3H) bzw. 89% (^{14}C) wiedergefunden.

1.3.2. Darstellung des fettsäurefreien Polysaccharides (LPS-hydraz.)

Nichtmarkiertes LPS (68 mg) und ^3H , ^{14}C -LPS ($1,8 \times 10^4$ ^3H - und $1,34 \times 10^5$ ^{14}C -CpM in 0,1 mg) wurden in wasserfreiem Hydrazin (1 ml) bei 105°C 35 Stunden erhitzt. Überschüssiges Hydrazin und die Fettsäurehydrazide wurden mit Aceton entfernt. Der Rückstand wurde zweimal in Wasser aufgenommen und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände, die das deacylierte LPS enthielten, wurden lyophilisiert: Ausbeute an LPS-hydraz. 30,5 mg. Eine Probe davon wurde verbrannt. Im LPS-hydraz. sind $8,12 \times 10^4$ ^{14}C -CpM (61% der eingesetzten Aktivität). Es wurde kein Tritium gefunden.

In den vereinigten Acetonlösungen (hauptsächlich Fettsäurehydrazide) wurden nach Verbrennung $1,33 \times 10^4$ ^3H -CpM (75%) und $1,78 \times 10^4$ ^{14}C -CpM (13,3%) gemessen (Tabelle 5.).

Tabelle 5. Isotopenverteilung nach Hydrazinolyse von ^3H , ^{14}C -LPS

	^3H	^{14}C
eingesetztes LPS	$1,81 \times 10^4$ 100 %	$1,34 \times 10^5$ 100 %
Fettsäurehydrazide	$1,33 \times 10^4$ 75 %	$0,17 \times 10^5$ 13 %
LPS-hydraz.	weniger als 25 0 %	$0,81 \times 10^5$ 61 %
Ausbeute an Radioaktivität	75 %	74 %

1.3.3. Darstellung der Fettsäuremethylester

Die Fettsäuren werden durch Methanolyse von ^3H , ^{14}C -LPS (0,74 mg) mit Bortrifluorid (14% in Methanol, 1 ml, 100°C, über Nacht) als Fettsäuremethylester freigesetzt. Nach Extraktion der Ester mit Chloroform wurde eine Probe auf Kieselgel dünn-schichtchromatographisch in nicht hydroxylierte und β -Hydroxy-Fettsäuren aufgetrennt. Aus den Flecken auf der Kieselgelplatte wurde die Radioaktivität nach Verbrennen bestimmt (Tabelle 6.).

Tabelle 6. Radioaktivitätsverteilung nach der Auftrennung der Fettsäuren

	R_f -Wert	^3H -CpM	^{14}C -CpM	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis
Auftragsstelle	0	160	4630	30 : 1
β -Hydroxymyristinsäure	0,3-0,4	6320	1560	1 : 4,0
nicht hydroxylierte Fettsäuren	0,7-0,95	1280	440	1 : 3,4
Verhältnis $\frac{\text{hydroxyliert}}{\text{nicht hydroxyl.}}$		4,9	3,5	
Molverhältnis $\frac{\text{hydroxyliert}}{\text{nicht hydroxyl.}}$ in Präparat 1		1,3		

Da keine geeignete radioaktive Standardprobe bis jetzt zur Verfügung stand, können die Ergebnisse nicht quantitativ ausgewertet werden.

Für die spätere Analyse der radioaktiven Substanzen in Urin ist wichtig, daß in den Fettsäuren nicht nur Tritium gebunden ist, sondern auch ein Teil der ^{14}C -Aktivität. Warum aber in den Hydroxyfettsäuren die vierfache Menge der Radiaktivität gebunden ist, die man in den nichthydroxylierten Fettsäuren findet, ist ungeklärt.

Tabelle 7. Berechnete Isotopenverteilung in ^3H , ^{14}C -LPS

	^3H	^{14}C	$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ - Verhältnis
^3H , ^{14}C -LPS	100 % ($0,151 \times 10^6$ ^3H -CpM)	100 % ($1,34 \times 10^6$ ^{14}C -CpM)	7,3
O-spezifische Kette und Kern	0 %	12 %	
Lipoid A	100 %	88 %	6,7
Glukosamin- disaccharid	0 %	85,1 %	
Fettsäuren	100 %	2,9 %	1 : 3,4* 1 : 4,0

* Vergleiche Tabelle 6.

1.4. Berechnung der Isotopenverteilung in ^3H , ^{14}C -LPS aus den Aktivitäten in Lipoid A, LPS-hydraz. und Fettsäuremethylestern

LPS-hydraz. ist tritiumfrei. Die Tritiummarkierung befindet sich nur in den abgespaltenen Fettsäuren. Der ^{14}C -Anteil in den Fettsäuren läßt sich aus dem Isotopenverhältnis in den Fettsäuren und der absoluten Tritiumaktivität errechnen: 2,9% der gesamten ^{14}C -Aktivität ist in den Fettsäuren lokalisiert. Im Lipoid A befinden sich 88% der ^{14}C -Isotope, also 85,1% im

Glukosamindisaccharid und 2,9% in den Fettsäuren. Die übrigen 12% sind im Kern und/oder im O-spezifischen Polysaccharid gebunden (Tabelle 7.).

1.5. Zusammenfassung von Kapitel 1.

Die umfangreichen Studien an Lipopolysaccharid aus Salmonella abortus equi erlaubten die Darstellung und Reinigung eines radioaktiven LPS-Präparates in drei Verfahrensschritten: Phenol/Wasser-Extraktion, Phenol/Chloroform/Petroläther-Extraktion und Elektrodialyse. Durch das gleichzeitige Angebot zweier verschiedener Radioisotope in unterschiedlichen Substraten wurden die Fettsäuren gezielt Tritium-markiert, während sich die ^{14}C -Aktivität über das ganze Lipopolysaccharid verteilt, jedoch zum überwiegenden Teil im Lipoid A wiedergefunden wird.

Ausgehend von $1,92 \text{ mg GlcNAc}$ ($500 \times 10^6 \text{ CpM}$) wurden in das Diglukosamin-disaccharid des Lipoid A, das (2,8% von 28 mg) 0,78 mg GlcN enthält, (85% von $37,4 \times 10^6 \text{ CpM}$) $31,4 \times 10^6 \text{ CpM}$ eingebaut. Von der maximal möglichen Ausbeute ($204 \times 10^6 \text{ CpM}$ in 0,78 mg) sind demnach 15,4% in das Disaccharid eingebaut. Von ^3H -Acetat werden dagegen nur 0,1% der möglichen Ausbeute gefunden. Der Wert für ^{14}C -Glukose kann wegen der Anwesenheit von GlcNAc im Kern nicht bestimmt werden.

Glukose und Acetat wurden nur zu einem geringen Teil in Lipopolysaccharid eingebaut, weil sie vom Bakterium für viele Stoffwechselwege verwertet werden können. Außerdem wird Acetat in Gegenwart von Glukose nur schlecht verwertet. GlcNAc wird außer für den Aufbau von LPS auch noch für die Mureinsynthese in großer Menge verwertet, dessen Polysaccharidketten aus GlcNAc und N-Acetylmuraminsäure gebildet werden; letztere wird ebenfalls ausgehend von GlcNAc synthetisiert.

Die spezifische Aktivität ($1,34 \times 10^6$ (^{14}C) bzw. $0,15 \times 10^6$ (^3H) CpM/mg) erscheint für biologische Untersuchungen hoch genug. Da 50 - 100 CpM noch bestimmt werden können, heißt das, daß 0,05-0,1 µg LPS wiedergefunden werden können. Für Vorversuche und vergleichende Untersuchungen wurden die Präparate 1 bis 4 benutzt.

Die Doppelmarkierung erlaubt, Veränderungen am LPS allein anhand von Veränderungen des Isotopenverhältnisses zu bestimmen. Dies gilt vor allem für Veränderungen am endotoxischen Teil von LPS, dem Lipoid A. Wie schon aufgezeigt wurde, ist die Anwesenheit von Fettsäuren für die toxischen Eigenschaften von LPS wesentlich. Da die Tritiummarkierung ausschließlich in den Fettsäuren gefunden wurde, kann man durch Messen des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten Aussagen über die Abspaltung von Fettsäuren, weniger gut über die Abspaltung von Polysaccharidbausteinen treffen. So bedeutet z.B. eine Verdoppelung des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnisses, daß der Gehalt an Fettsäuren halbiert wurde. Für in vivo-Untersuchungen an detoxifizierenden Organen und Zellen ist dieses LPS-Präparat deshalb besonders geeignet. Die Art der Markierung bietet darüber hinaus den Vorteil, daß man nicht nur intaktes LPS verfolgen, sondern auch Spaltprodukte identifizieren kann.

2. Untersuchungen an Urin und Kot von Meerkatzen und Ratten nach Injektion von radioaktiven LPS-Präparaten

Um einen Aufschluß über den Verbleib von Lipopolysaccharid in den Tagen nach der Injektion zu erhalten, haben wir die Ausscheidung von radioaktivem LPS im Urin und Kot von Meerkatzen und Ratten untersucht. Die Wahl solcher, LPS-unempfindlicher Tiere erlaubte, Lipopolysaccharid in Milligrammengen zu injizieren, ohne daß Schock-Symptome zu befürchten waren.

Solange der Harn sich in der Harnblase befindet, ist er bei gesunden Tieren steril. Solchen sterilen Harn kann man durch einen Blasenkatheter abnehmen. Diese Art der Harnentnahme läßt sich nur kurze Zeit im Tierversuch durchführen. Da aber der Versuch über einen längeren Zeitraum laufen sollte, entschieden wir uns für ein offenes System: Der Urin der Tiere läuft vom Käfigboden ab und wird in Vorratsflaschen gesammelt. Der Nachteil, daß dieser Urin nicht steril, sondern durch Keime der Umgebung kontaminiert ist, wurde durch die Möglichkeit aufgewogen, beliebig lange sammeln zu können. Die bakteriellen Verunreinigungen waren nicht radioaktiv markiert, und ihre Menge wurde durch das schnelle Einfrieren der Proben vergleichsweise klein gehalten.

Kot ist von Natur aus nicht steril, er enthält Gram-negative und -positive Bakterien, die aus der Darmflora stammen. Doch auch hier lassen sich Produkte aus den injizierten LPS-Präparaten von solchen aus den Darmbakterien durch ihre Radioaktivität differenzieren.

2.1. Haltung der Tiere

2.1.1. Meerkatzen

Die Versuche mit Meerkatzen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Helms im

Primate Center, Pinetown/Südafrika durchgeführt. Bei den Affen handelt es sich um Meerkatzen der Spezies Cercopithecus pygerythrus, die in Südafrika aus der Wildbahn gefangen wurden. Es wurden zwei Gruppen von je 5 Affen untersucht. Nach Injektion des LPS-Präparates in die Unterschenkel-Vene wurde der Urin zweimal täglich gepoolt und tiefgefroren. Die Urinproben wurden in gefrorenem Zustand per Luftfracht versandt und in Freiburg untersucht.

2.1.2. Ratten

Die verwendeten AS2-Albinoratten werden im Max-Planck-Institut (MPI) Freiburg seit 1967 in Bruder-Schwester-Verpaarung gezüchtet, seit 1971 unter spezifiziert-pathogenfreien (SPF) Bedingungen. Es wurden zwei Gruppen von 7 Ratten untersucht. Nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von LPS wurden Urin und Kot täglich gepoolt und tiefgefroren.

2.2. Ausscheidung im Meerkatzenurin

2.2.1. Urin nach Injektion von nichtmarkiertem LPS (Präparat 1)

LPS (Präparat 1) wurde in fünf Meerkatzen injiziert (5 mg/kg Körpergewicht, insgesamt 100 mg). Die Urinproben wurden durch Hämagglutinationshemmung (Falk, persönliche Mitteilung) auf O-Spezifität und durch Hämolysehemmung auf Lipoid A-Aktivität getestet. Es wurden bei der Hämagglutinationshemmung mit alkalibehandeltem S.abortus equi-LPS (LPS-OH) beladene Schafserthrozyten und Anti-S.abortus equi-Antiserum, bei der Hämolysehemmung entsprechend alkalibehandeltes Lipoid A (Lipoid A-OH), Anti-Lipoid A-Antiserum und zusätzlich Meerschweinchenkomplement benutzt. Es konnte keine O-spezifische Aktivität in den Urinproben nachgewiesen werden.

Nach saurer Hydrolyse zur Freisetzung von Lipoid A (1% Essigsäure, 100°C, 1 Stunde) und schwach alkalischer Hydrolyse (0,25 N Natronlauge, 56°C, 1 Stunde) der Urinproben wurde sowohl im Urin vor Injektion als auch in den Fraktionen nach Injektion Lipoid A-Spezifität identifiziert. In den ersten drei Fraktionen nach Injektion wurde ein erhöhter Lipoid A-Gehalt bestimmt: 1. (0-7 Std.) vierfach, 2. (8-22 Std.) zehnfach und 3. (23-31 Std.) zweieinhalb-fach erhöht gegenüber dem Niveau vor Injektion. In den späteren Fraktionen (32-80 Std.) wurde kein dem Niveau vor Injektion gegenüber erhöhter Lipoid A-Gehalt gefunden (Abb. VI.).

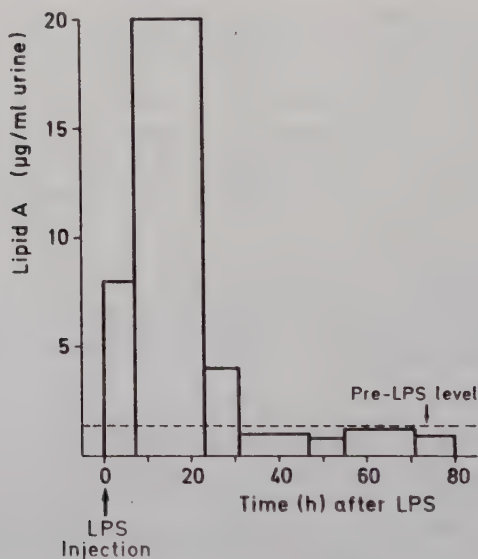


Abb. VI. Der Lipoid A Gehalt in Meerkatzenurin nach Injektion von nicht-markiertem S.abortus equi-LPS

Es konnte nicht unterschieden werden zwischen folgenden Möglichkeiten: Handelt es sich um Lipoid A oder um mit Lipoid A kreuzreagierende Substanzen ? Werden diese nach LPS-Injektion unspezifisch erhöht ? Stammt Lipoid A aus dem injizierten LPS oder von anderen Keimen, die nach LPS-Injektion verstärkt in den Organismus eindringen können und deren Lipoid A-Komponente dann im Urin ausgeschieden wird ?

Die Erhöhung der Lipoid A-Spezifität in Urin ist nur ein Hinweis auf eine Ausscheidung von LPS über die Niere durch den Harn. Da schon an Tag 2 der Gehalt auf das Niveau vor der Injektion sank, konnte die Ausscheidung im Urin über einen längeren Zeitraum mit serologischen Verfahren allein nicht untersucht werden. Bei den folgenden Versuchen wurden deshalb isotonenmarkierte LPS-Präparate eingesetzt.

2.2.2. Urin nach Injektion von Präparat 2 und Präparat 3 (^{14}C - und ^3H -LPS)

Je einer Gruppe von fünf Meerkatzen wurden mit einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht 120 mg Präparat 2 bzw. Präparat 3 injiziert (insgesamt $7,0 \times 10^5$ ^{14}C -CpM bzw. $4,0 \times 10^6$ ^3H -CpM).

Bei der ersten Gruppe wurde der Urin (im folgenden ^{14}C -Urin) zweimal täglich über drei Tage gepoolt und tiefgefroren, bei der zweiten Gruppe wurde der Urin (^3H -Urin) über 12 Tage mit zwei Fraktionen pro Tag gesammelt und eingefroren.

Wegen der geringen Konzentration der radioaktiven Substanzen in Urin wurden die ^{14}C -Urinproben konzentriert: 5 ml Urin wurden im Meßfläschchen lyophilisiert, in 1 ml Wasser gelöst und mit 10 ml Aquasol versetzt. Die Proben wurden halbiert und mit weiteren 5 ml Aquasol versetzt. Zu der einen Hälfte der Proben wurden 30 μl ^{14}C -Acetatlösung (2500 CpM) als innerer Standard zugesetzt. Nach der Messung der Proben wurde der Quenchfaktor

(75-90%) berechnet, und die Werte wurden korrigiert (Tabelle 8.*).

Die ^3H -Urinproben wurden nicht konzentriert, weil wegen der schwächeren Intensität der ^3H -Strahlung die Messung in höherem Maße von der Farbstoff- oder Salzkonzentration beeinflusst wird, so daß die Meßausbeute mit steigender Konzentration der in Urin vorhandenen Salze und gelben Stoffe stark verringert wird. Außerdem wurde später festgestellt, daß die ^3H -Aktivität flüchtig ist, so daß die Lyophilisation zum Verlust eines Teils der Aktivität geführt hätte. Von allen Urinfraktionen wurden Doppelproben (1 ml Urin + 10 ml Aquasol) hergestellt. Je eine Probe wurde mit 25 μl ^3H -Thymidinlösung (350 CpM) als innerem Standard versetzt. Nach Messung der Proben wurde der Quenchfaktor berechnet (30-50%), und die Werte wurden korrigiert (Tabelle 9.).

Bei den Tieren der ersten Gruppe summieren sich die Aktivität nach 67 Stunden zu 3,3% der injizierten ^{14}C -Menge, bei der zweiten Gruppe nach 12 Tagen zu 5,1% der ^3H -LPS-Gabe.

Die Kinetik der Ausscheidung in beiden Gruppen zeigt deutliche Unterschiede, selbst wenn man berücksichtigt, daß von der ersten Gruppe nur 3 Tage, von der zweiten dagegen 12 Tage Urin gesammelt wurde. Die Ausscheidung von ^{14}C im Urin zeigt einen Peak in der ersten Fraktion nach der Injektion, in der folgenden Fraktion fällt die Menge der ausgeschiedenen Aktivität ab. In den übrigen Fraktionen wird dann etwa gleichwenig Radioaktivität ausgeschieden. Auch die spezifische Aktivität von ^{14}C im Urin zeigt

* Das Probenverbrennungsgerät (zur Funktionsweise siehe E.7.2.3.3.), mit dem die Probenvorbereitung für die Szintillationszählung unabhängig von der Art der Probe standardisiert werden kann, stand erst gegen Ende der Doktorarbeit zur Verfügung. Zur Radioaktivitätsmessung der Urin- und vor allem der Kotproben mußten deshalb zunächst zum einen chemische Aufschlußverfahren angewendet werden und zum anderen jeweils radioaktive Präparate als innerer Standard zu den schon gemessenen Proben zugegeben werden.

einen Peak in der ersten Fraktion. Nach einem Abfall auf ein Drittel des ersten Peaks erreicht die radioaktive Konzentration bis zum dritten Tag wieder das Niveau der ersten Fraktion (Abb. VII.).

Die Ausscheidung im ^3H -Urin zeigt keinen Aktivitätspeak in der Fraktion unmittelbar nach Injektion (siehe Abb. VIII.). Die spezifische Aktivität in dieser Fraktion ist die geringste im ganzen Zeitraum. Sie steigt innerhalb von fünf Tagen auf ein Maximum, um dann wieder langsam abzufallen. Die Menge an ^3H -Aktivität, die im Urin ausgeschieden wird, scheint abhängig vom Urinvolumen. Vom dritten Tag nach Injektion an besteht ein direkter Zusammenhang von Urinvolumen und ^3H -Ausscheidung pro Tag bei fast gleichbleibender ^3H -Konzentration.

Eine Erklärung für die Unterschiede in den Ausscheidungskinetiken nach Präparat 2 und 3 wird später gegeben.

2.3. Ausscheidung in Urin und Kot von Ratten

Weil von den Meerkatzen nur wenige Prozente der injizierten Radioaktivität im Urin ausgeschieden wurden, gingen wir bei den Versuchen mit Ratten dazu über, auch den Kot der Tiere zu untersuchen. Aus den ersten Arbeiten von Braude et al. (1955), aber auch aus neueren Veröffentlichungen (Zlydaszyk und Moon, 1976; Mathison und Ulevitch, 1979), ist bekannt, daß Endotoxin von der Leber aufgenommen wird. Analog der Ausscheidung von Lipoiden über Leber und Darm, in Galle und Kot, läßt sich die Eliminierung von Lipopolysaccharid aus dem Organismus über diesen Weg vorstellen.

Der AS2-Rattenstamm ist in unserem Institut bereits für zahlreiche Versuche mit S.abortus equi-Lipopolysaccharid benutzt worden. So bestimmten Galanos et al. (1977a) die lethale Toxizität von LPS in diesen Tieren (5-10 mg/Tier, abhängig von der LPS-Salzform und dem Geschlecht der Ratten). Bei in

Tabelle 8. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von Meerkatzen nach intravenöser Injektion von ^{14}C -markiertem Lipopolysaccharid aus S. abortus equi

Nr.	Fraktion bis Stunde	ausgeschiedene Radioaktivität			pro Fraktion gefundene Aktivität		Gesamtausscheidung fortlaufend addiert ^{14}C -CpM($\times 10^{-3}$)	%a)
		ml	spezifische Aktivität ^{14}C -CpM/ml	spezifische Aktivität ^{14}C -CpM/ml	pro Fraktion gefundene Aktivität ^{14}C -CpM($\times 10^{-3}$)	%a)		
1	19	282	30,9	30,9	9,0	1,29	9,0	1,29
2	30	323	9,6	9,6	3,1	0,44	12,1	1,73
3	40	154	16,0	16,0	2,5	0,35	14,6	2,08
4	50	100	21,6	21,6	2,2	0,31	16,8	2,39
5	60	154	20,8	20,8	3,2	0,46	20,0	2,85
6	67	94	32,4	32,4	3,0	0,43	23,0	3,28

a) in % der injizierten Gesamtdosis

Präparat 2 (5800 ^{14}C -CpM/mg)

Dosis: intravenös 5 mg/kg Körpergewicht in fünf Meerkatzen, insgesamt 120 mg LPS

Radioaktivität: 700×10^3 ^{14}C -CpM

Alle Radioaktivitätsmessungen sind mit ^{14}C -Acetat als innerem Standard korrigiert

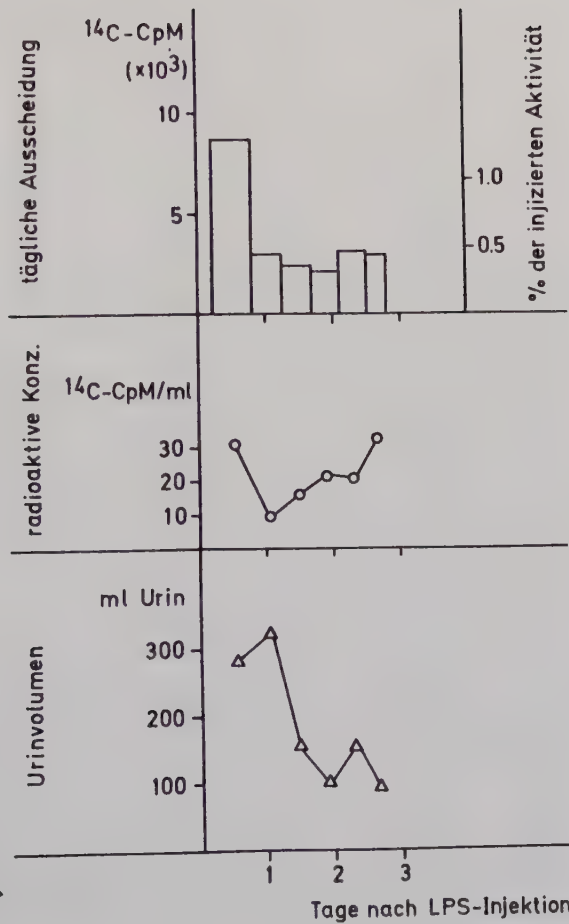


Abb. VII. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von fünf Meerkatzen nach Injektion von 120 mg S.abortus equi LPS mit 700×10^3 ^{14}C -CpM (Präparat 2)

Tabelle 9. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von Meerkatzen nach intravenöser Injektion von ^3H -markiertem Lipopolysaccharid aus Sabotus equi

Fraktion		ausgeschiedene Radioaktivität							
Nr.	bis Stunde Tag	ml	spezifische Aktivität ³ H-CpM/ml	pro Fraktion gefundene Aktivität ³ H-CpM (x10 ⁻³)	pro Tag gefundene Aktivität µM ³ H-CpM (x10 ⁻³)	pro Tag gefundene Aktivität µM ³ H-CpM (x10 ⁻³)	Gesamtausscheidung fortlaufend addiert ³ H-CpM (x10 ⁻³)	µM	
	5	-	-	-	-	-			
1	9	7	n.d.	n.d.					
2	19	179	23,9	4,3	0,11				
3	30	175	19,2	3,4	0,09				
		1	354	22,4		7,6	0,20	7,6	0,20
4	41	121	43,7	5,3	0,13				
5	50	98	42,3	4,1	0,10				
		2	219	43,0		9,4	0,23	17,1	0,43
6	66	111	86,6	9,6	0,24				
7	75	54	71,1	3,8	0,10				
		3	165	81,8		13,4	0,34	30,5	0,77
8	91	101	107,6	10,9	0,27				
9	98	61	47,7	2,9	0,07				
		4	162	83,4		13,8	0,34	44,3	1,11
10	115	103	122,3	12,6	0,32				
11	122	63	73,9	4,7	0,09				
		5	166	98,2		17,3	0,41	60,6	1,52
12	133	191	62,5	11,9	0,30				
13	146	113	54,8	6,2	0,16				
		6	304	73,2		18,1	0,56	78,7	1,98
14	163	78	96,1	7,5	0,19				
15	170	126	61,7	7,8	0,19				
		7	204	74		15,3	0,38	94	2,36
16	187	245	87,1	21,3	0,55				
17	194	156	43,3	6,8	0,16				
		8	401	70,3		28,1	0,71	122,1	3,07
18	211	110	97,0	10,7	0,27				
19	218	107	46,1	5,0	0,12				
		9	217	71,3		15,7	0,39	137,7	3,46
20	235	162	82,8	13,4	0,37				
21	242	96	57,5	5,5	0,14				
		10	258	74,0		18,9	0,48	156,6	3,94
22	259	294	62,8	17,8	0,45				
23	266	53	81,2	4,4	0,11				
		11	347	64,1		22,1	0,56	178,7	4,50
24	283	202	73,7	14,9	0,38				
25	290	217	53,1	11,5	0,29				
		12	419	63,7		26,4	0,67	205,1	5,17

a) in % der injizierten Gesamtdosis

Präparat 3 ($33\ 100\ ^3\text{H-CpM/mg}$)

Dosis: intravenös 5 mg/kg Körpergewicht in fünf Meerkatzen, insgesamt 120 mg LPS

Radioaktivität: $3979 \times 10^3\ ^3\text{H-CpM}$

Alle Radioaktivitätsmessungen sind mit ^3H -Thymin als innerem Standard korrigiert

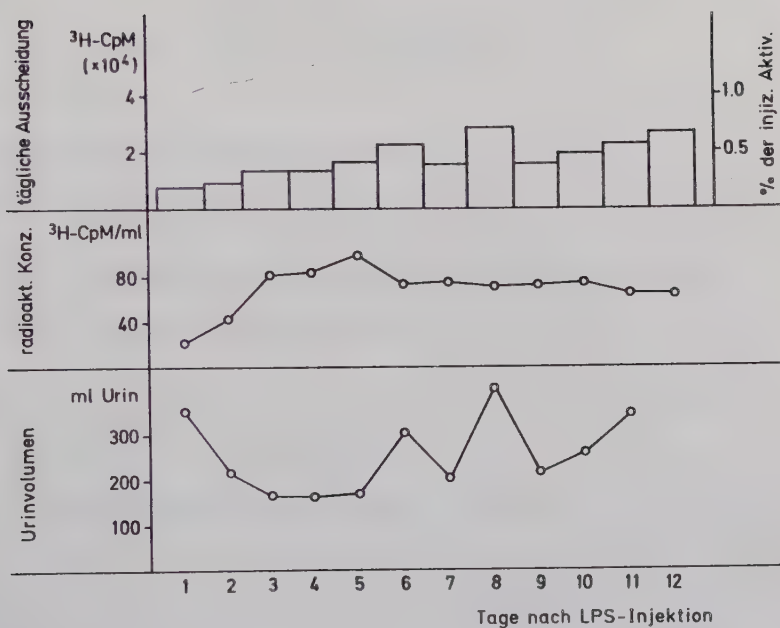


Abb. VIII. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von fünf Meerkatzen nach Injektion von 120 mg S.abortus equi LPS mit $4,0 \times 10^3$ $^3\text{H-CpM}$ (Präparat 3)

vitro- und in vivo- Versuchen fanden sie, daß LPS im Serum an High-density-Lipoprotein (HDL) gebunden wird (Freudenberg et al., 1980) und daß S.abortus equi-LPS nach intravenöser Injektion in Leber und Lunge der Ratten identifiziert werden kann (Ch. Galanos und M.A. Freudenberg, in Vorbereitung).

2.3.1. Rattenurin nach Injektion von Präparat 4 und 5

(^{14}C -LPS und ^3H , ^{14}C -LPS)

Einer Gruppe von sieben weiblichen AS2-Ratten wurden intraperitoneal (i.p.) je 2,05 mg LPS pro Tier (Präparat 4) injiziert. Insgesamt erhielten die sieben Ratten also 14,4 mg LPS mit $6,05 \times 10^6$ ^{14}C -CpM.

Eine zweite Gruppe von sieben männlichen AS2-Ratten erhielt i.p. je 1,2 mg LPS pro Tier (Präparat 5), insgesamt also 8,4 mg LPS mit $1,506 \times 10^6$ ^3H -CpM und $11,12 \times 10^6$ ^{14}C -CpM.

Urin und Kot wurden täglich als Pool gesammelt und tiefgefroren. Vom vierten bzw. fünften Tag an wurden die Proben in größeren Intervallen gepoolt und eingefroren. Der Versuch wurde mit der ersten Gruppe 13 Tage, mit der zweiten Gruppe 7 Wochen durchgeführt.

Von beiden Versuchsgruppen überlebten 13 Ratten, eine Ratte starb am achten Tag nach Injektion von Präparat 4. Die übrigen Tiere, die etwa vier Tage Krankheitssymptome zeigten (apathisches Verhalten, blutunterlaufene Augen, rauhes Fell, teilweise Durchfall und Blut im Urin), waren danach wieder gesund.

Zur Radioaktivitätsmessung wurden von den Urinproben der ersten Gruppe (^{14}C -Urin) Doppelproben von 2 ml in 7 ml Szintigel gemessen. Es wurde zu den gemessenen Proben ^{14}C -Acetat als innerer Standard ($5,2 \times 10^4$ CpM) zugesetzt und erneut gemessen. Der Quenchfaktor lag in den einzelnen Fraktionen zwischen 48 und 84% (Tabelle 10.A.Urin).

Die Urinproben der zweiten Gruppe (^3H , ^{14}C -Urin) wurden nach Verbrennung

im Probenverbrennungsgerät (je 0,5 ml Urin, unter Zusatz von 0,2 ml Combustaid) gemessen. Kontrollproben zeigten, daß 98% (^{14}C) bzw. 99% (^3H) der Aktivität identifiziert werden (Tabelle 11.A.Urin).

Auch im Rattenurin wurde (wie im Meerkatzenurin) nur ein kleiner Teil der Radioaktivität des injizierten Präparates wiedergefunden: nach Injektion von Präparat 4 nach 13 Tagen 4,72% und nach Injektion von Präparat 5 innerhalb von 8 Tagen 3,6% des Tritiums und 2,9% der ^{14}C -Aktivität.

Die ^{14}C -Aktivität in ^{14}C -Rattenurin und in ^3H , ^{14}C -Rattenurin zeigt einen Peak am ersten Tag nach Injektion. Danach sinkt in ^{14}C -Rattenurin die Aktivität auf unter 22% der Aktivität von Tag 1. Das Minimum tritt zwischen Tag drei und fünf auf mit nur 0,15% der injizierten Dosis pro Tag (Abb. IX.). In ^3H , ^{14}C -Urin steigt die tägliche Ausscheidungsrate an ^{14}C nach einem Minimum von 0,2% der injizierten Dosis an Tag 2 auf 0,4% (Tag 4) an, um dann wieder abzufallen.

Die ^3H -Aktivität in ^3H , ^{14}C -Urin zeigt keinen Peak an Tag 1, sondern nimmt bis zum Tag 3 hin zu, um dann abzufallen (Abb. X.).

Die Urinmenge nimmt innerhalb der 8 Tage bei ^3H , ^{14}C -Urin stetig ab. Dies kann versuchsbedingt sein. In den ersten Tagen saugten die Ratten an den Wasserflaschen, ohne zu trinken. Das Urinvolumen wurde erhöht. Später schieden die Tiere wieder mehr Kot aus, der Urin wurde teilweise vom Kot aufgesogen, das Urinvolumen wurde erniedrigt. Anhand der radioaktiven Konzentrationen lassen sich deshalb keine Charakterisierungen der Proben durchführen. Es bietet sich hier das $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis an, um Aussagen über das ausgeschiedene Material in ^3H , ^{14}C -Urin zu machen: Das injizierte Präparat 5 hat einen Quotienten von 7,3. Im Urin findet sich an Tag 1 ein Quotient von 11,36, an Tag 2 ein Abfall auf 2,22, danach über 1 Woche lang stetig ein Anstieg auf 10,71 an Tag 8 (Abb. XI.)

Tabelle 10.A. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von Ratten nach intraperitonealer Injektion von ^{14}C -markiertem Lipopolysaccharid aus S.abortus equi

Fraktion Nr.	bis Tag	ml	ausgeschiedene Radioaktivität		Gesamtausscheidung fortlaufend addiert ^{14}C -CpM ($\times 10^{-3}$) %
			spezifische Aktivität ^{14}C -CpM/ml	pro Fraktion ge- fundene Aktivität ^{14}C -CpM ($\times 10^{-3}$) %	
1	1	82	1336	109,5	1,80
2	2	54	272	14,7	0,25
3	3	34	262	8,9	0,15
4	5	61	296	18,0	0,30
5	7	110	323	35,5	0,59
6	13	344	289	99,2	1,64

a) in % der injizierten Gesamtdosis

Tabelle 11. Die Ausscheidung von Radioaktivität in Urin und Kot von Ratten nach intraperitonealer Injektion von ^3H , ^{14}C -markiertem Lipopolysaccharid aus *S. abortus equi*

Fraktion	ausgeschiedene Radioaktivität			pro Fraktion gefundene Aktivität		Gesamtausscheidung fort-		$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ - Isotopen- verhältnisse
	spezifische Aktivität CpM/ml:	(^3H) (^{14}C)	^3H -CpM ($\times 10^{-3}$)	^{14}C -CpM ($\times 10^{-3}$)	find addiert ^3H -CpM ($\times 10^{-3}$)	^{14}C -CpM ($\times 10^{-3}$)		
Nr.	bis Tag	ml		a)	b)	a)	b)	
<u>A. Urin</u>								
1	1	130	84	954	10,9	0,7	124	1,1
2	2	90	118	262	10,6	0,7	23,6	0,2
3	3	64	184	586	11,6	0,8	37,5	0,3
4	4	43	212	1070	9,1	0,6	46,0	0,4
5	6	52	190	1379	9,9	0,6	71,7	0,7
6	8	22	110	1192	2,5	0,2	26,2	0,2
<u>B. Kot</u>								
Nr.	bis	g	CpM/mg					
1	1	14,06	15,8	124,2	222,0	14,7	1748	15,7
2	2	5,00	23,8	193,4	119,0	7,9	967	8,7
3	3	4,73	16,2	135,0	76,4	5,1	638	5,7
4	4	2,62	11,0	105,2	29,9	1,8	276	2,5
5	6	11,62	4,6	51,6	53,0	3,5	601	5,4
6	8	15,00	2,0	24,8	29,7	2,0	372	2,7
7	11	36,10	1,0	14,0	34,6	2,2	493	4,5
8	21	130,0	0,6	8,8	74,7	5,0	1142	10,2
9	41	68,40	0,2	4,2	11,7	0,7	294	2,6
10	49	96,30	0,0	1,5	4,7	0,3	149	1,4

a) in % der injizierten ^3H -Dosis, b) in % der injizierten ^{14}C -Dosis

Präparat 5 (101×10^3 ^3H -CpM/mg und 1336×10^3 ^{14}C -CpM/mg)

Dosis: 1,2 mg / Ratte in sieben männliche ASZ Ratten, insgesamt 8,4 mg LPS

Radioaktivität: $1,506 \times 10^6$ ^3H -CpM und $11,121 \times 10^6$ ^{14}C -CpM

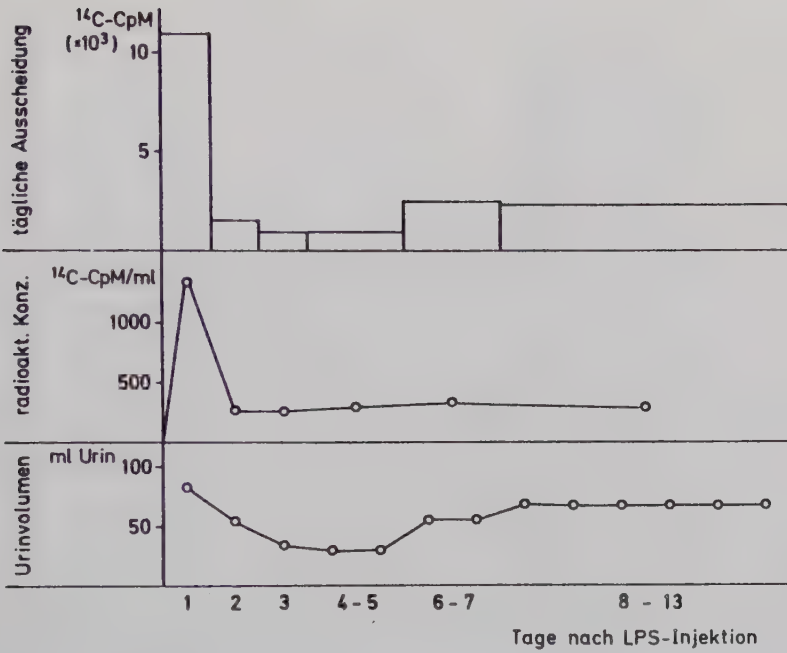


Abb. IX. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von sieben AS2-Ratten nach Injektion von 14,4 mg S.abortus equi-LPS mit $6,05 \times 10^6$ $^{14}\text{C-CpM}$ (Präparat 4)

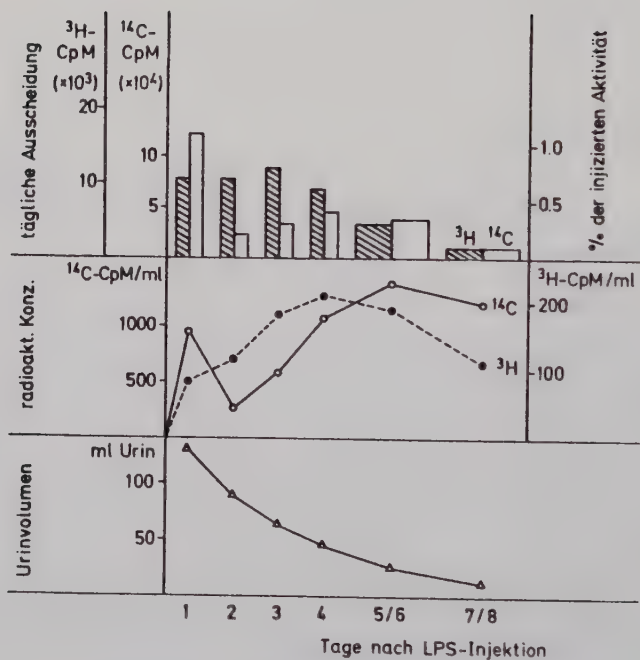


Abb. X. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Urin von sieben AS2-Ratten nach Injektion von 8,4 mg *S.abortus equi*-LPS mit $1,506 \times 10^6$ ^3H - und $11,121 \times 10^6$ ^{14}C -CpM (Präparat 5)

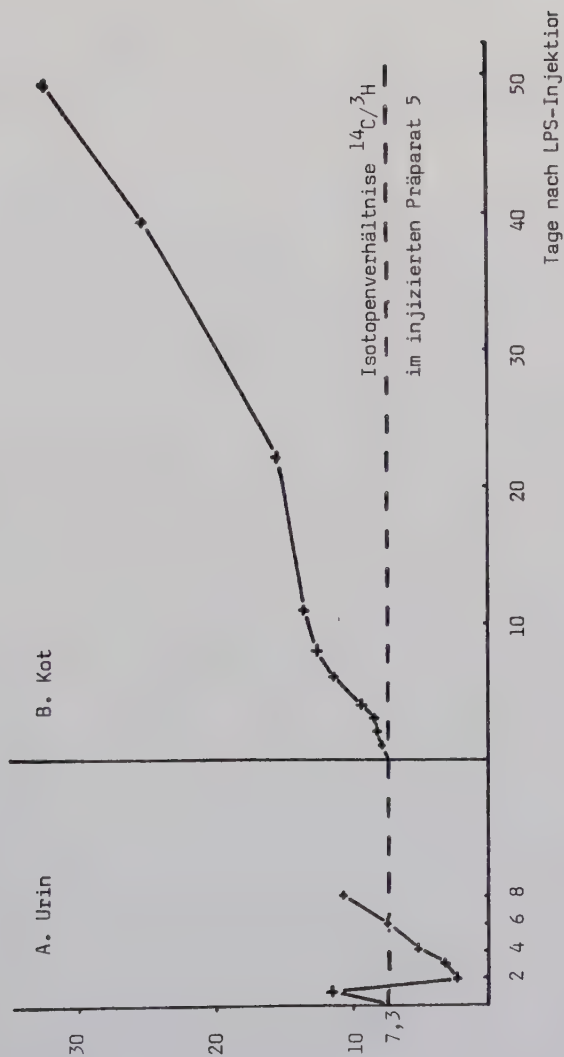


Abb. XI. Das Isotopenverhältnis im Urin und Kot nach Injektion von Präparat 5

2.3.2. Rattenkot nach Injektion von Präparat 4 und 5

Zur Messung der Kotproben wurden diese getrocknet und zermahlen. Eine Serie von Kotproben (^{14}C -Rattenkot: nach Injektion von Präparat 4) wurde im abgedichteten Meßgläschen mit Wasserstoffsuperoxid und Perchlorsäure (Vierfachproben von jeder Fraktion, je 25-65 mg Kotpulver, 0,5 ml 35% H_2O_2 und 0,25 ml 70% HClO_4 , 1 Stunde 70°C , anschließend Zugabe von 0,5 ml 20 M NaOH) aufgeschlossen und mit 15 ml Aquasol gemessen. Anschließend wurde 25 μl ^{14}C -Acetatlösung ($2,5 \times 10^4$ CpM) zugesetzt und der Quenchfaktor bestimmt. Dieser betrug zwischen 40-60% für Kotproben, 64% für Präparat 4 (100 μg) und 78% für Blindproben.

Eine zweite Serie von ^{14}C -Kotproben wurden in 1 ml Salzsäure (je eine Probe in 0,1 N, 1 N und 4 N Salzsäure) 1 Stunde bei 100°C hydrolysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,25 ml Wasserstoffsuperoxid entfärbt und mit 0,25 ml 20 M NaOH-Lösung versetzt. Das Sediment wurde mit 0,5 ml Wasserstoffsuperoxid und 0,25 ml 70% Perchlorsäure aufgeschlossen (1 Stunde, 70°C) und mit 0,5 ml 20 M NaOH versetzt. Zusammen mit 15 ml Aquasol wurden die Proben gemessen. Nach Zugabe von 30 μl ^{14}C -Standard ($3,1 \times 10^4$ CpM) wurden die Quenchfaktoren bestimmt: 42-61% im Überstand, 58-68% im unlöslichen Rückstand der sauren Hydrolyse. Mit vorangehender Hydrolyse lassen sich bis zu 100% mehr Radioaktivität finden als ohne (Tabelle 10.B.Kot). Da bei Kontrollproben mit Präparat 4 durch Oxidation nur 55% bzw. 68% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden wurden, scheint durch alleinige Oxidation nur ein unvollständiger Teil der Radioaktivität identifiziert worden zu sein. Erst durch Kopplung der Oxidation mit saurer Hydrolyse wurde der überwiegende Teil der Radioaktivität freigesetzt und gemessen.

Während die Molarität der Salzsäure keinen Einfluß auf die Wiederfindungsrate der radioaktiven Substanzen zeigte, stieg der Anteil der Aktivität im Überstand der Hydrolyse von 0,1 N zu 4 N hin an, der Anteil im Rückstand verringerte sich entsprechend. Aus Gründen der Übersicht wurden die Werte von Überstand und Sediment aus den drei parallelen Messungen zu einem zusammengefaßt.

Die Radioaktivität in den Kotproben nach Injektion von Präparat 5 (^{13}H , ^{14}C -Rattenkot) wurden nach Verbrennung von fünffachen Proben im Probenverbrennungsgerät bestimmt (30-200 mg Kotpulver unter Zusatz von drei bis fünf Spatelspitzen Zellulose; Tabelle 11.B.Kot).

Anders als im Urin, in dem ^3H und ^{14}C zwei verschiedenen Ausscheidungskinetiken folgten wurden im Kot für die ^3H - und die ^{14}C -Ausscheidung die gleiche Kinetik beobachtet. Die größte Isotopenmenge wurde in der ersten Fraktion nach Injektion gefunden: 15% (^3H) bzw. 16% (^{14}C) der injizierten Dosis. Danach nahm die tägliche Ausscheidungsrate stetig ab: In ^{14}C -Kot auf 1,6% nach 13 Tagen, in ^3H , ^{14}C -Kot auf 0,04% (^3H) und 0,2% (^{14}C) nach sieben Wochen. Die radioaktive Konzentration war im ^{14}C -Kot am Tag 1 nach Injektion, in ^3H , ^{14}C -Kot am Tag 2 (für beide Isotope) am größten (Abb. XII. und Abb. XIII.).

Über 7 Wochen wurden insgesamt ca. 60% der injizierten ^{14}C - bzw. 43% der ^3H -Isotopen im ^3H , ^{14}C -Kot wiedergefunden. Das Isotopenverhältnis stieg langsam von 7,8 auf 32 an (Abb. XI.).

Veränderungen im Isotopenverhältnis zeigen an, daß auch Veränderungen am LPS stattgefunden haben. In Urin war der ^3H -Anteil an Tag 2-4 erhöht, das Isotopenverhältnis fiel auf 2,2 ab. Dazu kann es einmal durch die Abspaltung von ^{14}C -markiertem Polysaccharid (O-Kette oder O-Kette plus Kern) kommen. In diesem Fall könnte das Isotopenverhältnis jedoch nicht unter 6,7 sinken (dem Wert für freies Lipid A; vergl. 1.4.). Da aber 2,2 als Quotient gemessen wurde, muß auch ^{14}C aus dem Lipid A von ^3H getrennt worden sein,

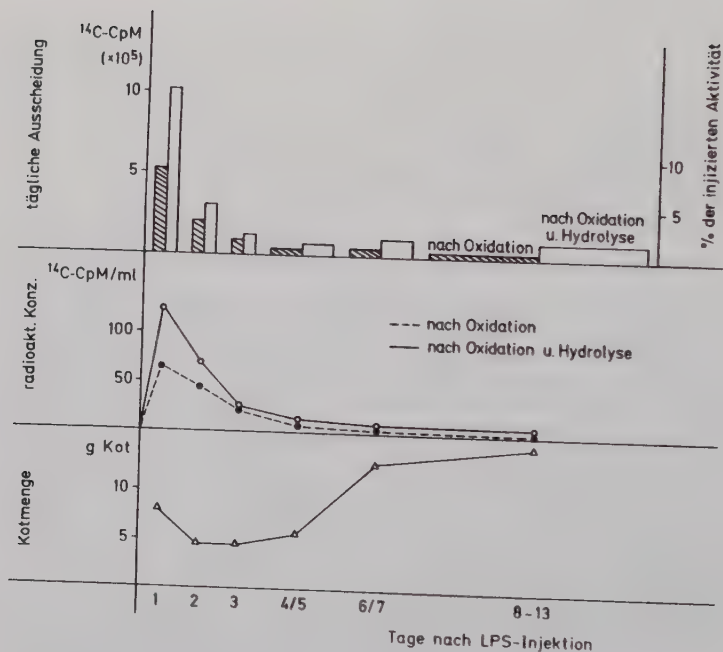


Abb. XII. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Kot von sieben AS2-Ratten nach Injektion von 14,4 mg S.abortus equi-LPS mit $6,05 \times 10^6$ $^{14}\text{C-CpM}$ (Präparat 4)

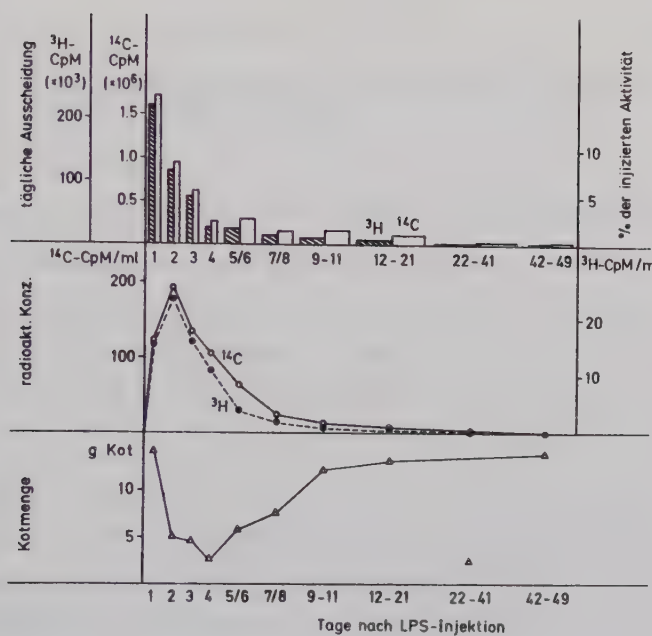


Abb. XIII. Die Ausscheidung von Radioaktivität im Kot von sieben AS2-Ratten nach Injektion von 8,4 mg *S.abortus equi*-LPS mit $1,506 \times 10^6$ ^3H - und $11,121 \times 10^6$ ^{14}C -CpM (Präparat 5)

d.h. es kam zu einer Abspaltung von Fettsäuren. Diese oder deren Abbauprodukte wurden dann in Urin verstärkt ausgeschieden. Dazu passen auch die Ergebnisse aus den übrigen Urin- und aus allen Kotfraktionen, die durch Erhöhung des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten Abspaltung von ^3H -Fettsäuren anzeigen.

2.4. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse der Kapitel 2.2. und 2.3.

Die Ausscheidung von Endotoxin durch den tierischen Organismus wurde durch die hier beschriebenen Versuche teilweise aufgeklärt. Während in Urin von Meerkatzen und Ratten nur wenige Prozent der injizierten Radioaktivität innerhalb von 8, 12 oder 13 Tagen wiedergefunden wurden, konnte im Kot von Ratten der Großteil der verabreichten Radioaktivität nachgewiesen werden: 60% innerhalb von 7 Wochen.

Die Abbildung XIV. zeigt, daß die Kurve der Gesamtausscheidung immer flacher wird. Daraus und aus der abnehmenden spezifischen Aktivität der Kot- und Urinproben folgt, daß etwa 50% der ^3H - und etwa 35% der ^{14}C -Aktivität des $^3\text{H}, ^{14}\text{C}$ -LPS nach 7 Wochen im Körper verblieben sind bzw. verbleiben, oder auf anderen Wegen als durch Niere und Darm aus dem Organismus eliminiert werden. Darauf soll in den folgenden Abschnitten nochmals eingegangen werden.

Die Ausscheidung des größten Teils der Radioaktivität im Kot ist ein weiterer Beweis für die zentrale Rolle der Leber bei der Reaktion des Organismus auf Endotoxin. Ob in der Leber auch enzymatische Veränderungen am LPS Molekül stattfinden, bleibt vorläufig unsicher.

Anhaltspunkte für enzymatische in vivo-Veränderungen am Lipopolysaccharidmolekül bieten die unterschiedlichen Ausscheidungskinetiken von ^3H - und

^{14}C -Isotopen in Urin. Die verwendeten *S.abortus equi*-Lipopolysaccharid-Präparate waren so markiert, daß ^3H vorwiegend in den Fettsäuren gebunden war, sei es im ^3H -LPS, sei es im $^3\text{H}, ^{14}\text{C}$ -LPS (vergl. 1.4.), während die ^{14}C -Markierung an das Polysaccharid und das Lipoid A-Gerüst gebunden war. Während die ^{14}C -Ausscheidung in ^{14}C -Meerkatzen-, in ^{14}C -Ratten- und in $^3\text{H}, ^{14}\text{C}$ -Rattenurin einen Peak in der ersten Fraktion nach Injektion zeigen und danach ein Minimum, verfolgt die ^3H -Konzentration in ^3H -Meerkatzen- und in $^3\text{H}, ^{14}\text{C}$ -Rattenurin einen Anstieg bis zum vierten bzw. fünften Tag, die ^3H -Ausscheidung hängt danach von dem Urinvolumen ab, je mehr Urin ausgeschieden wird, desto höher ist die ^3H -Ausscheidung. Dies gilt vor allem für ^3H -Meerkatzenurin.

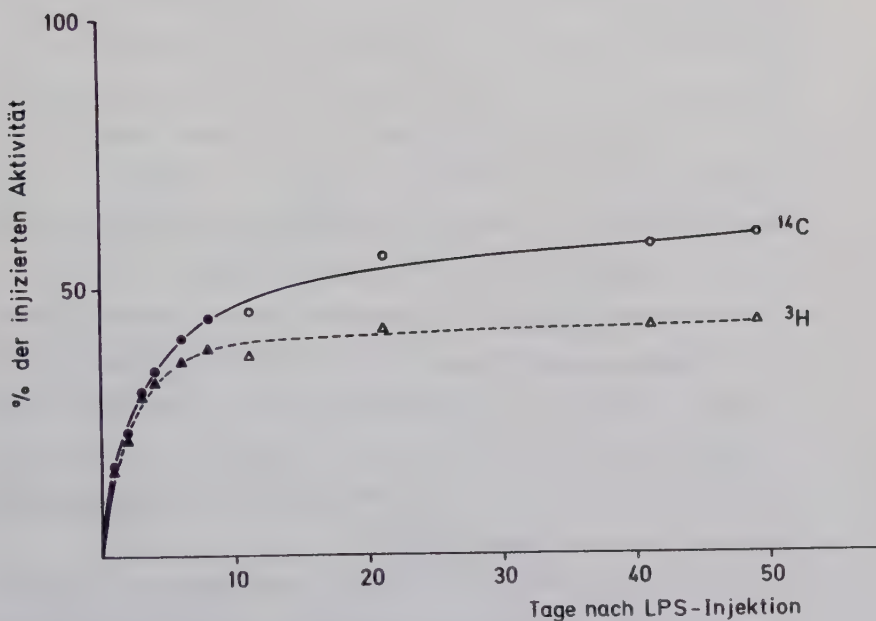


Abb. XIV. Die Summe der ausgeschiedenen Radioaktivität in Urin und Kot (ausgefüllte Symbole) bzw. in Kot allein (offene Symbole) nach Injektion von Präparat 5

2.5. Versuche zur Charakterisierung der radioaktiven Ausscheidungsprodukte: Dialyse von Urin und Kot

In diesem Teil der Arbeit wird die Anreicherung und Charakterisierung der in Urin und Kot gefundenen radioaktiven Produkte beschrieben. Erste Versuche der Dialyse von Urinproben lieferten Anhaltspunkte für Veränderungen an LPS. Sowohl Urin- als auch Kotproben wurden daraufhin dialysiert. Die dialysierbaren und zurückgehaltenen Anteile wurden getrocknet und analysiert. Die Versuche sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.5.1. Dialyse von Meerkatzenurin

^{14}C -Meerkatzenurin (je 10 ml) wurden im Dialyseschlauch gegen Wasser (3-5 x 90 ml) dialysiert. Das Retentat wurde getrocknet. Das Dialysat wurde nach Trocknung wieder in 10 ml Wasser aufgenommen. Je 5 ml davon wurden mit 0,5 ml 35% H_2O_2 entfärbt (2 Stunden, 78°C). Die Proben wurden erneut getrocknet und wie das Retentat in 1 ml Wasser aufgenommen und mit 10 ml Aquasol versetzt. Nach Halbierung wird zu jeder Hälfte 5 ml Aquasol zugesetzt. Zu einer der Doppelproben wurden 15 μl ^{14}C -Acetat (2500 CpM) als innerer Standard zugegeben. Der Quenchfaktor wurde berechnet (75-90%) und die Meßwerte wurden korrigiert. In Tabelle 14. werden verglichen für die einzelnen Fraktionen die Aktivität in Urin (Spalte 2) mit der in den Dialyseprodukten (in % der injizierten Dosis, Spalte 3), die Summe aus den Dialyseprodukten als % der Urinaktivität (Spalte 4) und der prozentuale Anteil der Aktivität im Dialysat (Spalte 5).

In den getrockneten Produkten der Fraktion 1 nach Inkubation wurden 31% mehr an Radioaktivität gefunden, als in Urin identifiziert wurde. Ein Quencheffekt sollte durch die Messung mit innerem Standard korrigiert worden sein, Farbeffekte wurden durch Entfärbung mit H_2O_2 ausgeschaltet,

allerdings wurde kein Unterschied zwischen H_2O_2 behandelten und nicht behandelten Proben festgestellt. Aber auch nach Verbrennung von Dialyseprodukten aus ^3H , ^{14}C -Rattenurin und -kot tritt in der ersten Fraktion nach Injektion dieser Effekt einer um bis zu 80% erhöhten Wiederfindungsrate auf.

Tab. 14. Verteilung der Radioaktivität bei der Dialyse von Meerkatzenurin

Fraktion	% der injizierten Radioaktivität	Summe der Radioaktivität aus Retentat und Dialysat		Anteil im Dialysat
		% der injizierten Radioaktivität	% der in Urin gefundenen Radioaktivität	
1	1,29	1,69	131	31,3
2	0,44	0,36	81	66,7
3	0,35	0,32	91	71,4
4	0,31	0,28	83	71,0
5	0,46	0,42	91	65,5
6	0,43	0,42	97	58,8

In den übrigen Fraktionen des dialysierten Meerkatzenurins wurden zwischen 81 und 97% der im Urin identifizierten Aktivität wiedergefunden. Während in der ersten Fraktion nach Injektion 31% der Aktivität durch den Dialyseschlauch diffundieren kann, steigt dieser Anteil in den folgenden Fraktionen auf 71% an und fällt in der letzten Fraktion wieder auf 59% ab.

2.5.2. Dialyse von Rattenurin

Die gesamten ersten vier Urinfraktionen des ^3H , ^{14}C -Rattenurins wurden bis auf je 10 ml je vier- bis fünfmal gegen 2 ltr Wasser dialysiert. Die ersten vier Liter Dialysat wurden eingengt und getrocknet (2,3-4,5 g). Ebenso wurde das Retentat getrocknet (50-210 mg). Die größte Menge an Dialysat und

Retentat wurde in der Fraktion von Tag 2 gewonnen. Das Retentat von Tag 1 und das Dialysat von Tag 4 enthielten jeweils die geringste Substanzmenge.

Zur Radioaktivitätsmessung wurden Dreifachproben verbrannt (50-80 mg vom Dialysat (ca. 2%), 5-15 mg vom Retentat (ca. 5%) unter Zusatz von Zellulose. Die ^3H -Konzentrationen pro mg im Dialysat sind außer in der Fraktion 1 (3,6 CpM/mg) unter 0,5 CpM/mg, im Retentat nach 21 CpM/mg (Tag 1) 1,0 - 2,8 CpM/mg. Die ^{14}C -Konzentrationen sind im Dialysat 56 (Tag 1) bzw. 3,5 - 6,4 CpM/mg (Tag 2-4) und im Retentat 673 (Tag 1) bzw. 46 - 125 CpM/mg (Tag 2-4).

Tab. 15. Radioaktivitätsverteilung bei der Dialyse von Rattenurin

Fraktion	Radioaktivität im Urin		Radioaktivität in Dialysat und Retentat				Anteil im Dialysat		$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis	
	% ^{a)}		% ^{a)} % ^{b)}				% ^{c)}		Dialysat	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	Retentat	U
1	0,73		0,81	112			77,5			
		1,12		2,06		185		36,1	30,2	15,4
2	0,71		0,11	16			82,2			
		0,21		0,39		184		74,6	36,4	23,2
3	0,78		0,05	6			61,0			
		0,34		0,12		58		61,0	38,5	31,0
4	0,61		0,05	8			78,7			
		0,41		0,27		66		75,2	47,2	38,9

a) % der injizierten Dosis: $100\% = 1,506 \times 10^6 \text{ } ^3\text{H-CpM}$
bzw. $11,12 \times 10^6 \text{ } ^{14}\text{C-CpM}$

b) % der in Urin gefundenen Radioaktivität

c) % der Summe aus Dialysat und Retentat

Analog zu Tabelle 14 wurden in Tabelle 15. die prozentuale Ausscheidung in Rattenurin, die Summe aus den Dialyseprodukten einmal als % der injizierten Dosis, einmal als % der Aktivität im Urin miteinander verglichen, außerdem der prozentuale Anteil des Dialysates, jeweils für beide Isotope. Darüber hinaus ist das Isotopenverhältnis in den Dialyseprodukten sowie im Urin angegeben.

Von ^{14}C an Tag 1 und 2 wurden 185% der Aktivität des Urins gefunden (Dialysat plus Retentat an Tag 3 und 4 entsprechend 58 bzw. 66%). Von der ^3H -Urin-Aktivität wurden nach 112% am Tag 1 an den drei folgenden Tagen nur 16 - 6% in den getrockneten Produkten wiederentdeckt. Auf diesen hohen Verlust an ^3H -Aktivität wird im folgenden noch genauer eingegangen (vergl. 2.5.4.). Von Tag 1 an sind mehr als 75% der nichtflüchtigen ^3H -Aktivität dialysierbar. (Wegen der extrem geringen Konzentration an radioaktiven Substanzen sind die gemessenen 61% an Tag 3 mit einem statistischen Fehler von mehr als 100% belastet). Dagegen sind von der ^{14}C -Aktivität an Tag 1 36%, an den folgenden Tagen 61-75% dialysierbar. Das Isotopenverhältnis im Dialysat steigt von 15,4 auf 38,9; im Retentat wird ein Quotient gefunden, der von 30,3 auf 47,2 ansteigt.

2.5.3. Dialyse von Rattenkot

Suspensionen von ^3H , ^{14}C -Rattenkot (zwischen 6 und 1,5 g in 150 ml) wurden in einer Dialysekammer jeweils gegen vier ltr Wasser membranfiltriert. Das Filtrat (= Dialysat) wurde eingeengt und getrocknet. Auch das Retentat wurde getrocknet. Das Verhältnis der getrockneten Produkte lag zwischen 6:1 und 1:1 (Retentat zu Dialysat). Von den getrockneten Präparaten wurden Dreifachproben (10-100 mg, unter Zusatz von Zellulose) verbrannt. Die ^3H -Konzentration im Dialysat ist extrem niedrig: 1,1 CpM/mg an Tag 1,

anschließend unter 0,5 CpM/mg. In einer Fraktion ließ sich kein Tritium messen. Die ^{14}C -Aktivität im Dialysat ist 2,0 CpM/mg und höher, im Retentat sind sowohl die ^3H - als auch die ^{14}C -Konzentration ähnlich hoch wie in Kot selbst (vergl. Tabelle 13.).

In Tabelle 16. sind die Ergebnisse analog den anderen Tabellen zusammengestellt: Die Ausscheidung in Kot in % der injizierten Aktivität, die Summe der Aktivität in den Dialyseprodukten in % der Aktivität im Kot, der % Anteil des Dialysates in der wiedergefundenen Aktivität und die Isotopenverhältnisse in Kot, Retentat und Dialysat.

Auch hier wurde im Dialysat und Retentat der Fraktionen von Tag 1 und 4 mehr Radioaktivität gefunden als in Kot. Nur etwa 1% der Aktivität war dialysierbar, sowohl der ^{14}C - als auch der ^3H -Aktivität. Das Isotopenverhältnis des im Retentat verbliebenen Präparates lag etwas niedriger als das in Kot selbst, der entfernte ^{14}C -Anteil wurde im Dialysat wiedergefunden. Wegen der niedrigen ^3H -Konzentration im Dialysat lassen sich nicht überall Isotopenverhältnisse angeben. Solche Werte, bei denen die ^3H -Aktivität unter 0,5 CpM/mg lag, sind eingeklammert.

2.5.4. Untersuchung der flüchtigen radioaktiven Substanzen

Bei mehreren Versuchen wurde gefunden, daß ^3H -markierte Substanzen aus Urin in hohem Maße flüchtig sind.

Nach der Lyophilisation von ^3H -Meerkatzenurin (nach Präparat 3) wurden in den getrockneten Proben nur 20,6 - 28,2% der ursprünglichen Aktivität wiedergefunden (Tabelle 17., Messungen von getrockneten Proben in 1 ml Wasser + 15 ml Aquasol, korrigiert mit innerem Standard, 15 μl ^3H -Thymidin 650 CpM).

Tabelle 16. Radioaktivitätsverteilung bei der Dialyse von Rattenkot

Fraktion bis Tag	Radioaktivität in Kot %a)		Radioaktivität Dialysat plus Retentat %b)		Anteil im Dialysat %c)		$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnisse in	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	Kot	Retentat Dialysat
1	14,7	15,7	117	109,8	0,66	1,1	7,87	7,2 12,2
2	7,9	8,7	91	82,5	0,44	1,1	8,07	7,5 (22)
3	5,1	5,7	93	89,3	()	0,8	8,35	7,9 ()
4	1,8	2,5	131	127,5	0,58	1,7	9,55	9,2 (28)
6	3,5	5,4	44,6	42,6	1,26	3,5	11,35	10,6 (26)

a) in % der injizierten Dosis von Präparat 5

b) in % der in Kot gefundenen Radioaktivität

c) % der Summe aus Dialysat und Retentat

Tabelle 17. Lyophilisation von ^3H -Meerkatzenurin

Fraktion von Tag	1	2	8
Ausgangsaktivität in Urin	3100 CpM in 130 ml	2300 CpM in 120 ml	6100 CpM in 70 ml
Lyophilisat	640 CpM in 3,3 g	650 CpM in 3,8 g	1500 CpM in 2,5 g
Ausbeute an Radioaktivität	20,6%	28,2%	24,6%

Weiterhin wurden Doppelproben von ^3H , ^{14}C -Rattenurin (0,5 ml) lyophilisiert und unter Zellulosezusatz verbrannt. Mehr als 90% des Tritium sind von Tag 2 an flüchtig, die ^{14}C -Aktivität wurde vollständig in den lyophilisierten Proben gefunden.

Daraufhin wurden 5 ml ^3H , ^{14}C -Urinproben der Fraktion 1-3 in einer Destillationsbrücke bei 80 Torr destilliert. Das Wasser geht bei 45°C über. Es wurden ca. 4,5 ml überdestilliert. Die Radioaktivitätsmessung im Destillat (Doppelproben von 0,5 ml in 10 ml Aquasol) ergab kein ^{14}C , es wurde nur ^3H gefunden. Die Aktivität steigt von 62 CpM/ml (Tag 1) auf 186 CpM/ml (Tag 3). Von Tag 1 bis Tag 3 ergänzen sich die Aktivitäten von Lyophilisat und Destillat (also des festen und des flüchtigen Anteils) zu den aus Urin gemessenen Ergebnissen, wie aus Tabelle 18. ersichtlich ist, d.h. die ^3H -Aktivität im Urin ist an flüchtige Substanzen gebunden, die bei Lyophilisation verschwinden und bei vorsichtiger Destillation im Destillat erscheinen.

Tabelle 18. Isotopenverteilung nach Destillation und Lyophilisation von Rattenurin

Fraktion	Urin		Lyophilisat		Destillat	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
1	84	954	20	880	64	-
2	118	262	(5)	290	110	-
3	184	586	(8)	600	186	-

Aktivität je ml Urin

2.5.5. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse von 2.5.

Es wird noch einmal daraufhin gewiesen, daß die ^3H -Aktivität der LPS-Präparate 3 und 5 aufgrund der Wahl von ^3H -Acetat als Substrat bei der Züchtung der Bakterien (fast) ausschließlich in den Fettsäuren von LPS gebunden ist.

Während sowohl im Meerkatzen- als auch im Rattenurin an Tag 1 erst ca. 35% der ^{14}C -Aktivität dialysierbar sind, steigt dieser Anteil auf über 60% in den folgenden Tagen. Die Tritiumaktivität in Urin wird nur an Tag 1 wiedergefunden, an den folgenden Tagen ist bis auf 16-6% das gesamte Tritium flüchtig (bei der Ratte). Die Aktivitäten in Meerkatzenurin (nach Präparat 3) waren zu niedrig für Dialyseversuche. Hier wurde durch Lyophilisation gezeigt, daß über 80% der Aktivität schon an Tag 1 flüchtig sind. Der nichtflüchtige ^3H -Anteil ist im Gegensatz zu ^{14}C schon an Tag 1 zu 77,5% dialysierbar (bei der Ratte). In Rattenkot sind demgegenüber nur 1% der ^{14}C - und weniger als 1% der ^3H -markierten Substanzen dialysierbar.

Ein wichtiger Indikator für in vivo-Veränderungen am LPS-Molekül sollte das

Isotopenverhältnis sein. Wie aus Abbildung XI. und den Tabellen 15. und 16. zu ersehen ist, ist sowohl das Isotopenverhältnis im Urin und in den Dialyseprodukten aus Urin, ebenso wie im Dialysat aus Kot gegenüber dem ursprünglichen Wert von 7,3 stark verändert. Auf die Absenkung im Urin wird unten eingegangen. Der Anstieg des Quotienten in den erwähnten Dialyseprodukten auf bis zu 47,2 zeigt, daß in den ersten Tagen bis zu 87% (d.h. 6 von 7) der Fettsäuren bei den identifizierten Produkten abgespalten sind. Diese Fettsäuren scheinen zu Wasser metabolisiert zu werden.

Wenn man annimmt, daß in vivo die Fettsäuren zu Wasser abgebaut werden, dann müßte man folgern, daß das Wasser über den ganzen Organismus verteilt wird. Die in Urin ausgeschiedene Radioaktivität verhält sich dann zur gesamten (verteilten) Aktivität wie das Urinvolumen zur gesamten Flüssigkeitsmenge im Körper. Wie in Meerkatzenurin (nach Präparat 3; vergl. Tabelle 9. und Abb. VIII.) beobachtet wurde, ändert sich die Ausscheidung an ^3H mit dem Urinvolumen, was diese Annahme stützt. Ebenso läßt sich auch der Unterschied erklären zwischen dem Urin, der von 8 Uhr bis 15 gesammelt wurde und dem, der von 15 bis 8 Uhr gesammelt wurde (Tabelle 9.). Im ersteren ist die radioaktive Konzentration durch das Trinkwasser, das die Tiere tagsüber aufnehmen, verdünnt, über Nacht aber wird weniger Wasser aufgenommen, so daß der Organismus durch neu abgebautes LPS die Aktivität in der Körperflüssigkeit wieder erhöht. Solange die Tiere krank sind, vermindert trinken und Urin ausscheiden, reichert sich das ^3H -Wasser im Körper an. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Tiere gesund werden, normal trinken und Urin ausscheiden, wird die spezifische ^3H -Aktivität im Tagesmittel langsam niedriger.

Wie oben schon erwähnt, sinkt der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotient in Rattenurin am Tag 2 auf 2,2, um dann bis auf 10,8 anzusteigen. Zu diesem starken Abfall kann es nicht allein durch Abspaltung von ^{14}C aus O-Kette und Kern kommen, denn

dann dürfte der Wert nicht unter 6,7 sinken, dem $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis von freiem Lipoid A. Die Analyse der getrockneten Produkte nach Dialyse zeigt ab Tag 2 Isotopenverhältnisse von über 23 bis zu 47. Es besteht eine offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Tritiumgehalt im Urin und dem in den getrockneten Dialyserückständen. Das gleiche gilt auch für Urin und den Urinrückstand nach Lyophilisation. Mit Ausnahme der Fraktion von Tag 1 nach Injektion ist aus den übrigen Fraktionen die gesamte ^3H -Radioaktivität flüchtig, während die ^{14}C -Aktivität quantitativ nicht flüchtig ist. Dagegen konnten wir bei Destillation der Proben die flüchtige ^3H -Substanz zurückgewinnen. Dabei wurde im Destillat kein ^{14}C gefunden. Wenn es sich um ein flüchtiges Abbauprodukt der Fettsäuren mit Bindung von ^3H und ^{14}C an das gleiche Molekül handelte, wären noch 20-40 ^{14}C -CpM identifizierbar gewesen - dem Erwartungswert aufgrund des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten in den Fettsäuren von Präparat 5.

Aufgrund unserer Untersuchungen nehmen wir deshalb an, daß es sich bei der flüchtigen radioaktiven ^3H -Substanz um tritiiertes Wasser handelt.

Aus diesem Schluß ergeben sich für die Ausscheidung von Radioaktivität zwei weitere Wege: ^3H -Wasser kann auch ausgeschwitzt oder in der Atemluft ausgeatmet werden. Vielleicht kann man dadurch erklären, daß von Tritium nur 45%, von ^{14}C aber 65% der injizierten Dosis in den Ausscheidungsprodukten wiedergefunden wurden (vergl. Abbildung XIV.)

Möglicherweise werden nicht nur Fettsäuren vom LPS-Molekül abgespalten. Wahrscheinlich wird auch das Polysaccharid abgebaut. Es ist überraschend in diesem Zusammenhang, daß im Dialysat von Rattenurin (Tag 1) das Verhältnis der Isotopen mit 15,4 so niedrig ist, denn auch ein von 3-4 Fettsäuren befreites LPS oder Lipoid A sollte undialysierbar sein (Ch. Galanos, pers. Mitteilung). Hier muß noch untersucht werden, ob eine oder mehrere radioaktive Substanzen vorliegen, z.B. ein Oligosaccharid mit ^{14}C und eine andere

Substanz mit ^3H . Die wachsende Dialysierbarkeit der ^{14}C -Aktivität im Urin spricht für einen Abbau des deacylierten Lipopolysaccharides, das nach den bisherigen Molmassenbestimmungen (Galanos, 1977) mit etwa 15000 (D) nicht dialysierbar sein sollte.

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß zu einem nicht unerheblichen Teil die Fettsäuren vom LPS abgespalten worden sind. Eine Bilanz wird in der Diskussion (Abschnitt 3.3.) versucht. Die abgespaltenen Fettsäuren wurden zu Wasser abgebaut. Auch das deacylierte Lipopolysaccharid wurde teilweise in kleinere Bruchstücke zerlegt.

2.6. Untersuchungen zur Anreicherung und Charakterisierung der ausgeschiedenen radioaktiven Substanzen

Unter Anwendung verschiedener Methoden haben wir versucht, ein angereichertes radioaktives Präparat zuerst aus Urin, später aus Kot zu isolieren.

2.6.1. Untersuchungen an Meerkatzenurin

2.6.1.1. Phenol/Wasser-Extraktion mit Meerkatzenurin

In Analogie zu der Lipopolysaccharid-Extraktion von der Bakterienoberfläche wurde versucht, aus Meerkatzenurin mit der Phenol/Wasser-Methode nach Westphal et al. (1952) ein radioaktives Präparat zu isolieren.

^{14}C -Meerkatzenurin (200 ml = 3400 ^{14}C -CpM) von Tag 1 nach Injektion wurde dialysiert. Das Retentat wurde mit der Phenol/Wasser-Methode extrahiert (20 ml 90% Phenol, 2 x 20 ml Wasser). Die vereinigten wäßrigen Phasen und die phenolische Phase wurden dialysiert.

Dialysate und Retentate wurden getrocknet. Proben wurden in 1 ml Wasser und 10 ml Aquasol auf Radioaktivität gemessen. Der Quenchfaktor wurde durch Zugabe von ^{14}C -Acetat (6500 CpM) als inneren Standard bestimmt: 90-95% je nach Probe (Tabelle 19.).

Tabelle 19. Phenol/Wasser-Extraktion von Meerkatzenurin

Ausgangssubstanz	Dialysat		Retentat	
(Urinlyophilisat	118,5 mg	3400 CpM)		
Wäßrige Phasen	17,08 mg	430 CpM	15,4 mg	1930 CpM
Phenolische Phase	19,29 mg	35 CpM	26,4 mg	45 CpM

Die Hauptmenge der Radioaktivität wurde in der wäßrigen Phase wiedergefunden und war nicht dialysierbar. Ein geringerer Teil aus der wäßrigen Phase war dialysierbar. Praktisch keine Radioaktivität wurde in der phenolischen Phase gefunden. Der nicht dialysierbare Anteil der Radioaktivität aus der wäßrigen Phase entsprach etwa 0,32 mg injiziertem LPS*. Die spezifische Aktivität von injiziertem ^{14}C -LPS war 5800, die des Urins 28,8 und die des hochmolekularen wäßrigen Extraktes 106,6 ^{14}C -CpM/mg. Es handelte sich also um eine vierfache Anreicherung.

* Nach den Ergebnissen von Kapitel 2.5. darf davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem ausgeschiedenen radioaktiven Material nicht mehr um intaktes LPS handelt. Deshalb ist ein direkter Vergleich mit Ausgangs-LPS nicht möglich. In Ermangelung anderer Bezugsgrößen wird das ausgeschiedene Material aber dennoch mit dem injizierten Präparat verglichen.

2.6.1.2. Äthanol-fällung mit Meerkatzenurin

^3H -Meerkatzenurin (Fraktionen von Tag 1, 2 und 8) wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat (ca. 3 g) wurde in Wasser (20 ml) gelöst und mit absolutem Äthanol versetzt (180 ml, Endkonzentrat 90%). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Überstand und Niederschlag wurden getrocknet und auf ihre ^3H -Aktivität hin gemessen (Tabelle 20.).

Tabelle 20. Radioaktivitätsverteilung bei der Äthanol-fällung von ^3H -Meerkatzenurin

Fraktion Nr. von Tag	2		3		16	
	1		2		8 nach Injektion	
Urin	130ml	3100 CpM	120ml	2300 CpM	70ml	6100 CpM
Lyophilisat	3,3g	520 CpM	3,8g	550 CpM	3,0g	n.d.
<u>Äthanol-fällung:</u>						
Überstand	2,5g	330 CpM	2,9g	420 CpM	2,0g	600 CpM
Niederschlag	0,77g	310 CpM	0,80g	230 CpM	0,56g	900 CpM
Summe (Niederschlag + Überstand)		640 CpM		650 CpM		1500 CpM
% aus Urin		20,6 %		28,2 %		24,6 %

In allen drei Fraktionen verteilt sich die Radioaktivität zwischen Niederschlag und Überstand größenordnungsmäßig im Verhältnis 1:1.

2.6.1.3. Gelpermeationschromatographie mit Meerkatzenurin

20 ml ^3H -Meerkatzenurin (nach Präparat 3, vom Tag 10 nach Injektion) wurden getrocknet, in 3 ml Wasser wieder aufgenommen und auf einer Sephadex G 10 Säule in Pyridin-Acetat-Puffer (300 ml Gelbett, $\varnothing = 2,5$ cm,

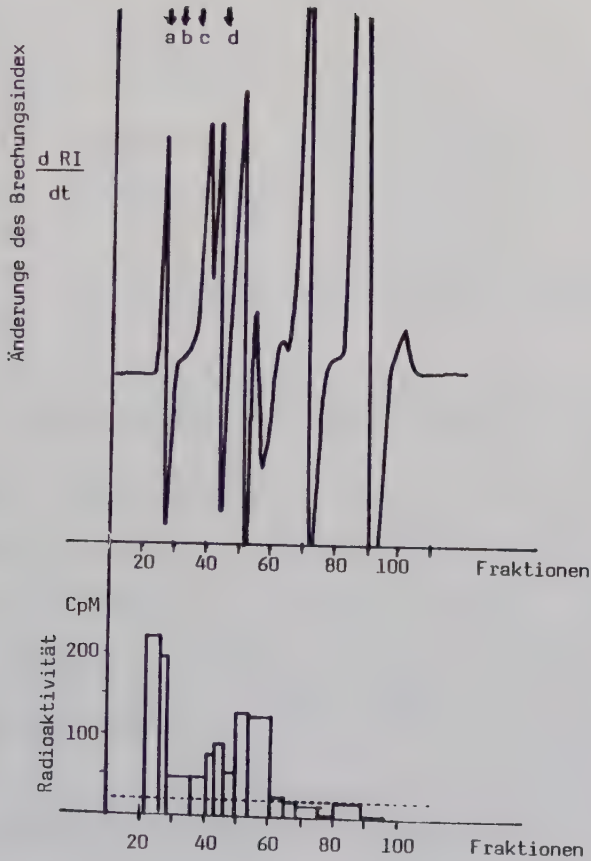


Abb. XV. Gelpermeationschromatographie von Meerkatzenurin
an Sephadex G10

Eichung der Säule mit: a) Dextran Blau 2000 (ca 2×10^6 (D))
 b) Hexasaccharid (1000 (D))
 c) Tetrasaccharid (672 (D))
 d) Disaccharid (344 (D))

10 ml/Std., Fraktionen zu 2,5 ml) chromatographiert. Das Eluat wurde über den Brechungsindex kontrolliert (Abb. XV.). Fraktionen wurden nach dem Elutionsprofil gepoolt und lyophilisiert. Die Proben wurden in 0,5 ml Wasser und 10 ml Aquasol wieder aufgenommen. Die aus den Proben gemessene Radioaktivität ist ebenfalls in Abbildung XV. aufgezeichnet. Das radioaktive Material verteilte sich über einen weiten Trennbereich, es sind ein Peak im Ausschlußvolumen (größer als 1500 (D)) und zwei im Trennbereich (bei 340 (D) und bei etwa 180 (D)) zu erkennen. Die Säule wurde mit einer Standardlösung von Blue Dextran 2000, Hexa-, Tetra- und Disacchariden geeicht.

2.6.1.4. Zusammenfassung der Versuche an Meerkatzenurin

Es ist möglich, aus Urin ein radioaktives Präparat anzureichern. Bei den untersuchten Präparaten war aber die Radioaktivität, vor allem durch die Flüchtigkeit der ^3H -Aktivität zu gering, um mehrstufige Verfahren zu erproben: Bei β -Strahlern wie ^3H und ^{14}C kann der Teil der Aktivität, der für die Messung der Radioaktivität verwendet wird, nicht wiedergewonnen werden. Je geringer die Aktivität der Probe, desto mehr Material muß zum Messen aufgewendet werden. Fraktionierungen in viele einzelne Proben wie bei der Gelpermeationschromatographie waren deshalb für die Proben aus Meerkatzenurin nur unter analytischen, nicht aber unter präparativen Gesichtspunkten sinnvoll.

Die analytischen Schlüsse aus den beschriebenen Verfahren sind, daß ein Teil der Radioaktivität, sei es bei Phenol/Wasser-Extraktion, sei es bei Gelpermeationschromatographie noch höhermolekular vorliegt: Ein wesentlicher Teil der Radioaktivität war nicht dialysierbar und wurde im Ausschlußvolumen eluiert. Andererseits wurde trotz vorhergehender Dialyse des Urins noch ein Fünftel der Aktivität vom Tag 1 nach der Phenol/Wasser-Extraktion

dialysierbar. Von dem nichtflüchtigen ^3H -Anteil in Meerkatzenurin (ca. 30%) wurde mehr als die Hälfte der Aktivität im Bereich von Mono- und Disacchariden eluiert. Daraus kann man schließen, daß ein anderer Teil der Aktivität niedermolekular, aber nicht in Form von radioaktivem Wasser vorliegt.

Die Äthanol-fällung, die generell zur Reinigung von Lipopolysaccharid (Westphal et al., 1952a) oder deacyliertem Lipopolysaccharid (Malchow et al., 1969) verwendet wird, führte bei Urin zu zwei Fraktionen, einer löslichen und einer unlöslichen (jeweils ca. 50% der Radioaktivität). Polysaccharid und LPS sind in 90% Äthanol unlöslich. Weitere Versuche wurden mit Urin noch nicht durchgeführt, weil die niedrigen radioaktiven Konzentrationen nicht erlauben, Isolierungsverfahren auszuprobieren: Der größte Teil des Materials wird für die Messung der Radioaktivität verbraucht.

2.6.2. Isolierung eines radioaktiven Präparates aus Rattenkot

Versuche, ein radioaktives Präparat aus Kot zu isolieren, schienen vielversprechender. Denn im Rattenkot wurde im Vergleich zu Urin das zehnfache der Aktivität ausgeschieden: In den ersten beiden Tagen nach Injektion von LPS wurden in ^{14}C -Rattenkot $1,3 \times 10^6$ ^{14}C -CpM (21,9% der injizierten Dosis) und in ^3H , ^{14}C -Rattenkot 340×10^3 ^3H -CpM und $2,7 \times 10^6$ ^{14}C -CpM (22,6 bzw. 24,4% der injizierten Aktivität) gefunden.

2.6.2.1. Phenol/Wasser-Extraktion von Rattenkot

^{14}C -Rattenkot (6 g = 389 000 CpM) von Tag 1 nach Injektion wurde nach der Phenol/Wasser-Methode extrahiert (20 ml 90% Phenol, 4 x 20 ml Wasser; nach Westphal et al., 1952). Die vereinigten wäßrigen Phasen und die phenolische Phase wurden zur Entfernung des Phenols dialysiert. Die Radioaktivität im

Dialysat ist geringer als 0,5% der eingesetzten Aktivität. Aus der phenolischen Phase wurden ein löslicher und ein unlöslicher Anteil erhalten. Diese und die Lösung aus der wäßrigen Phase wurden getrocknet (Tabelle 21.).

Tabelle 21. Phenol/Wasserextraktion von Rattenkot

Präparat	Ausbeute	Radioaktivität
in der wäßrigen Phase	123,6 mg	$3,5 \times 10^4$ CpM
in der phenolischen Phase	101 mg	$3,1 \times 10^4$ CpM
im unlöslichen Rückstand	3835 mg	$42,1 \times 10^4$ CpM

Die Messung erfolgte nach Oxidation mit H_2O_2 /Perchlorsäure, Korrektur der Meßwerte mit ^{14}C -Acetat als innerem Standard.

Nach der Extraktion blieb der größere Teil der Radioaktivität im Rückstand. Nur etwa jeweils 6-7% sind gleichermaßen in wäßriger und phenolischer Phase gelöst. Intakte S-Form-Lipopolysaccharide, wie das injizierte S.abortus equi-LPS, werden in der wäßrigen Phase gefunden.

Nach den Versuchen von Galanos und Lüderitz (1975) über die Löslichkeit der verschiedenen Salzformen von LPS kann man vermuten, daß das radioaktive Material im Rückstand durch die Anwesenheit von mehrfach geladenen Kationen unlöslich gehalten wird. Deshalb wurde versucht, diese mit Äthylendiamin-tetraessigsäure-natriumsalz (EDTA) zu komplexieren. Nach der Dialyse der Rückstandssuspension (2,5 g in 80 ml Wasser) gegen 0,05 M EDTA-Lösung bei pH 7 wurde jedoch nur ein kleiner Teil der Radioaktivität löslich: 6300 CpM in 46,9 mg.

Zum anderen wurde eine Probe des Rückstandes (nach Dialyse gegen 0,05 M EDTA) elektrodialysiert (2,06 g = $2,31 \times 10^5$ CpM in 100 ml Wasser; 200 V, max. 50 mA; 8 mal Wasserwechsel in den äußeren Kammern, Endpunkt 200 V, 11 mA). Die Suspension aus der Mittelkammer (pH 4,8) wurde mit TEN

neutralisiert. Nach Zentrifugation wurde der Rückstand mit Wasser extrahiert (3 x 100 ml, 15 min. Ultraschall, 60°C). Die Überstände (TEN-Überstand) und der Rückstand wurden getrocknet: Ausbeute 159,4 mg bzw. 1,7 g. Die Lösung aus der anodischen Kammer wurde mit Natriumhydroxid, die aus der kathodischen mit Salzsäure neutralisiert und getrocknet. Das anodische Präparat ist stark hygroskopisch. Aus der Tabelle 22. erkennt man, daß ca. 60% der radioaktiven Substanz in eine lösliche Form überführt worden sind.

Tabelle 22. Elektrodialyse des nach Phenol/Wasser-Extraktion unlöslichen Rückstandes

<u>Ausgangspräparat</u>	2060 mg	$2,31 \times 10^5$ CpM
<u>Elektrodialyse:</u>		
TEN-Überstand	159,4 mg	$1,12 \times 10^5$ CpM
Rückstand	1690 mg	$0,73 \times 10^5$ CpM
anodische Kammer	n.b.	(20) CpM
kathodische Kammer	36,3 mg	(20) CpM

2.6.2.2. Phenolischer Aufschluß von ^{14}C -Rattenkot

Im Vorversuch mit nichtaktivem Kot schien die Löslichkeit von Kot in 90% Phenol größer zu sein als in Wasser oder dem Phenol/Wasser-Gemisch.

Deshalb wurde ^{14}C -Rattenkot (1 g = 64500 CpM) vom Tag 1 nach Injektion mit 90% Phenol extrahiert (3 x 20 ml 90% Phenol, 50°C, 15 min Ultraschall). Der Rückstand wurde mit Aceton phenolfrei gewaschen und getrocknet (A: 0,79 g = 37000 CpM). Der Überstand von 90% Phenol wurde mit Wasser auf 80% Phenol eingestellt. Dabei fällt ein Niederschlag (B) aus. Dieser Niederschlag wurde in Wasser suspendiert. In Lösung gingen 5,5 mg (C: 410 CpM), unlöslich blieben 24 mg (D: 10900 CpM). Der Überstand von 80% Phenol wurde durch

mehrfache Destillation mit Wasser von Phenol befreit und lyophilisiert (E: 84 mg = 2600 CpM).

Tabelle 23. Phenolischer Aufschluß von ^{14}C -Rattenkot

Präparat	Gewicht		Aktivität CpM ($\times 10^{-4}$)
^{14}C -Rattenkot	1000	mg	6,55
(A) Sediment 90% Phenol	790	mg	3,70
(B) Niederschlag 80% Phenol:			
(C) wasserlöslich	5,5	mg	0,04
(D) wasserunlöslich	24	mg	1,09
(E) Lösung 80% Phenol	84	mg	0,26

Das Sediment (A) ($0,79 \text{ g} = 3,7 \times 10^4 \text{ CpM}$) wurde in Wasser (6 ml) suspendiert und elektrodialysiert: 130 V, 60 mA max., 6 Stunden. Die elektrodialysierte Lösung (pH 4,8) wurde mit TEN neutralisiert und zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit Wasser ausgezogen. Die Überstände (Ü(TEN)) wurden vereinigt und lyophilisiert ($46,4 \text{ mg} = 3,3 \times 10^4 \text{ CpM}$), ebenso wurde das Sediment getrocknet ($376 \text{ mg} = 2,08 \times 10^4 \text{ CpM}$). Die Lösung aus der anodischen Kammer (pH 2,4) wurde mit Natriumhydroxid, die aus der kathodischen Kammer (pH 11,4) mit Salzsäure auf pH 7 gebracht und lyophilisiert.

Es wurden in der anodischen Kammer weniger als 1000 CpM (in 114 mg), b) in der kathodischen Kammer weniger als 250 CpM (Menge wegen starker Hygroskopie nicht bestimmt) gefunden. In beiden Kammern wurde also keine nennenswerte Radioaktivität gefunden. Die Aktivität ist nicht dialysierbar. Durch die Elektrodialyse und die anschließende Neutralisation mit TEN wurde der überwiegende Teil der radioaktiven Substanzen (61% der eingesetzten Menge) in wasserlöslichem Zustand gewonnen.

Auch im Falle des Rückstandes der Phenol/Wasser-Extraktion wurden durch

die Elektrodialyse 60% der Radioaktivität in Lösung gebracht (vergl. 2.6.2.1.). Bei beiden Versuchen wurde durch Dialyse kein radioaktives Material verloren. Die Anreicherung in beiden Fällen ist 11-fach.

Diese Ergebnisse führten dazu, ohne vorhergehende Extraktionsversuche das homogenisierte Kotmaterial direkt zu elektrodialysieren.

2.6.2.3. Elektrodialyse von ^{14}C -Rattenkot

^{14}C -Rattenkot vom Tag 2 nach Injektion ($2\text{ g} = 1,43 \times 10^5\text{ CpM}$) wurde in wäßriger Suspension (140 ml) in einer Elektrodialysenkammer bis zur Konstanz von Strom und Spannung elektrodialysiert (beendet bei 200 V und 20 mA). Die Dialysate in den äußeren Kammern wurden gesammelt, neutralisiert und lyophilisiert: anodisch 413,8 mg mit weniger als 100 CpM; kathodisch (hygroskopisch) mit weniger als 100 CpM.

Zur Abtrennung von gelösten, nicht radioaktiven Substanzen wurde die Lösung aus der Mittelkammer vor der Neutralisation zentrifugiert. Der Überstand ($\text{Ü}(\text{H}^+)$, pH 4,9) wurde mit TEN neutralisiert und lyophilisiert: 33 mg = $2,3 \times 10^3\text{ CpM}$

Nach Neutralisation mit TEN wurde der Rückstand dreimal mit Wasser (je 150 ml) ausgezogen. Überstand ($\text{Ü}(\text{TEN})$) und Rückstand wurden getrocknet: $\text{Ü}(\text{TEN})$ 563 mg = $1,14 \times 10^5\text{ CpM}$; Sediment 880 mg = $0,082 \times 10^5\text{ CpM}$.

Nur ein geringer Teil der Radioaktivität ist im sauren Überstand ($\text{Ü}(\text{H}^+)$) nach der Elektrodialyse gelöst ($2,3 \times 10^3\text{ CpM}$, d.h. 2% der Aktivität aus Kot). Keine Radioaktivität findet sich in den Außenkammern. 91% der Aktivität wurde im TEN-Überstand gefunden, der Rest von 7% blieb im Rückstand unlöslich. Im Überstand ist die Anreicherung etwa dreifach. Zwar ist der Anreicherungsgrad noch gering. Im Vergleich mit den Rückständen nach Phenol- und Phenol/Wasser-Extraktion (siehe 2.6.2.2.), bei denen ca. 60% der

Radioaktivität mit elfacher Anreicherung in Lösung gebracht wurden, sind hier 91% der Aktivität in eine lösliche Form überführt worden.

Unter den gleichen Bedingungen wurde Kot elektrodialysiert, der vor Injektion von ^{14}C -LPS gesammelt worden war. Aus 2 g Kot wurden 300 mg Überstand und 1,1 g Rückstand erhalten.

2.6.2.4. Phenol/Wasser-Extraktion mit den durch Elektrodialyse löslichen Präparaten

Der nach Neutralisation mit TEN lösliche Überstand aus 2.6.2.2. (Ü(TEN)) wurde Phenol/Wasser verteilt (36 mg = $2,5 \times 10^4$ CpM; 20 ml 90% Phenol, 2 x 20 ml Wasser). Zur Entfernung des Phenols wurden wäßrige und phenolische Phase am Rotationsverdampfer mehrfach mit Wasser eingengt. Anschließend wurde das Material aus der phenolischen Phase zentrifugiert. Überstand (B) und Rückstand (C) sowie das wasserlösliche Material (A) wurden lyophilisiert. Proben wurden in 0,5 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von 10 ml Aquasol gemessen.

Tabelle 24. Phenol/Wasser-Extraktion mit den aus Kot löslichen radioaktiven Präparaten

Ausgangsmaterial (Ü(TEN))	36 mg	$25,0 \times 10^3$ CpM
Extraktion:		
(A) wäßrige Phase	9,16 mg	$3,1 \times 10^3$ CpM
phenolische Phase:		
(B) Überstand	17,6 mg	$21,4 \times 10^3$ CpM
(C) Rückstand	7,78 mg	$6,5 \times 10^3$ CpM
Ausbeute	34,6 mg	$31,0 \times 10^3$ CpM

Die Ausbeute an Material ist 96%, an Radioaktivität ca. 120% (erklärbar, da der Quenchfaktor im Ausgangsmaterial und in den erhaltenen Proben nicht bestimmt wurde). Der größte Teil der Radioaktivität war in der Phenolphase (Überstand B), fast 70% der eingesetzten Aktivität.

Ein gleicher Versuch wurde mit Ü(TEN) aus 2.6.2.3. gemacht. Auch hier waren 70% der eingesetzten Aktivität anschließend im phenolischen Überstand.

2.6.2.5. Protein- und Aminosuckergehalt der aus Kot erhaltenen, löslichen Präparate

Proben der aus ^{14}C -Kot gewonnenen TEN-Überstände nach Elektrodialyse wurden 24 Stunden mit 4 N Salzsäure hydrolysiert, anschließend im Aminosäureanalysator untersucht: Ü(TEN) aus 2.6.2.2. enthält 18% Protein, 1,3% Glukosamin und ca. 0,8% andere Aminosucker, vor allem Galaktosamin. Der Überstand Ü(TEN) aus 2.6.2.3. enthält 36% Protein, 1,25% GlcN und 1,4% Galaktosamin (GalN). Der nichtaktive Überstand aus 2.6.2.3. enthält 28% Protein, 1,37% GlcN und etwa 1% GalN. Aus diesen Zahlen geht hervor, daß ein Viertel bis ein Drittel des löslichen Präparates aus Proteinen besteht, der Rest wahrscheinlich aus Polysacchariden, vielleicht Nukleinsäuren und anderen löslich gewordenen Substanzen. Im gesamten isolierten Ü(TEN) (563 mg, aus 2.6.2.3.) sind nur ca. 0,3 mg (= 0,5%) radioaktives Lipopolysaccharid bzw. Abbauprodukte davon.

Der Gehalt an GlcN in den drei untersuchten Proben ist etwa gleich. Vergleicht man im Ü(TEN) die Radioaktivität von 214 CpM/mg mit dem GlcN-Gehalt, dann entsprechen diese 214 CpM/mg nur 0,002% GlcN, tatsächlich findet man 1,25%, im Verhältnis zur Radioaktivität ist der GlcN-Gehalt also etwa 500-fach überhöht.

2.6.2.6. Elektrodialyse von ^3H , ^{14}C -Rattenkot

Auch nach Injektion von Präparat 5 wurden wie bei Präparat 4 an den ersten beiden Tagen nach Injektion insgesamt über 20% der injizierten Radioaktivität ausgeschieden.

Dialysierte Proben aus den beiden ersten Fraktionen (vergl. 2.5.3: 2,5 g von Tag 1; 0,75g von Tag 2) wurden elektrodialysiert (Suspension in 150 ml Wasser, 200 V, 80 mA; Wasserwechsel bis zur Konstanz von Strom und Spannung; Endpunkt bei 220 V, 15-20 mA). Die Aufarbeitung der elektrodialysierten Suspension erfolgte wie in 2.6.2.3. beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25. zusammengestellt.

Tabelle 25. Elektrodialyse von ^3H , ^{14}C -Rattenkot.

Präparat	g	CpM ($\times 10^{-4}$)		$^{14}\text{C}/^3\text{H}$ - Verhältnis
		^3H	^{14}C	
Vordialysierter Kot von Tag 1	2,5	5,7	41,3	7,3
TEN-Überstand	0,56	4,96	36,8	7,4
Rückstand	1,37	0,12	0,95	7,9
Vordialysierter Kot von Tag 2	0,75	2,62	19,9	7,6
TEN-Überstand	0,18	2,23	15,7	7,6
Rückstand	0,34	0,097	0,63	6,5

Die Ausbeute an radioaktivem Material ist jeweils 90%.

Die Lösungen aus anodischer und kathodischer Kammer wurden verworfen, nachdem keine Radioaktivität in ihnen nachgewiesen werden konnte.

Das $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis im löslichen TEN-Überstand ist gleich dem im eingesetzten Präparat. Die Isotopenverhältnisse in den Rückständen sind innerhalb der Meßgenauigkeit gleich denen in den Ausgangsmaterialien.

2.6.2.7. Zusammenfassung von 2.6.2.

Nach Phenol- bzw. Phenol/Wasser-Extraktion blieb der größte Teil der Radioaktivität im unlöslichen Rückstand, 85 bzw. 90%. Durch Elektrodialyse und Neutralisation mit Triäthylamin (TEN) wurde der überwiegende Teil der unlöslichen radioaktiven Substanzen in eine wasserlösliche Form überführt.

Dieses Verhalten der ausgeschiedenen radioaktiven Substanzen läßt sich dadurch erklären, daß im Kot polyvalente Kationen enthalten sind, die LPS in Form hochmolekularer, unlöslicher Aggregate komplexieren können. Erst bei der Elektrodialyse werden diese Komplexe dissoziiert, wobei geladene niedermolekulare Substanzen entfernt werden und LPS bzw. partiell degradiertes LPS nach Neutralisation mit TEN als Triäthylammoniumsalz in Wasser übergeht. Es stellte sich heraus, daß ähnlich wie bei der Dialyse der Kotproben auch bei der Elektrodialyse keine radioaktiven Substanzen durch die Dialysemembran diffundieren. Deshalb konnte im Fall des ^3H , ^{14}C -Kotes die Elektrodialysedauer dadurch stark verkürzt werden, daß ein vordialysiertes Kotpräparat anstelle von Kot eingesetzt wurde.

Bisher wurden noch kein Präparate untersucht, die später als Tag 3 nach Injektion ausgeschieden wurden. Wie das Isotopenverhältnis zeigt, ist das später ausgeschiedene Material immer mehr deacyliert. Da aber die Menge der ausgeschiedenen Radioaktivität sinkt und andererseits die von den Ratten ausgeschiedene Kotmenge von Tag 4 an wieder erhöht ist, haben wir uns bisher auf die ersten Fraktionen nach Injektion beschränkt.

Wie die Analyse der nach Elektrodialyse löslichen Präparate zeigt, enthalten sie Protein und Polysaccharid: 25-40% sind Protein. Die Präparate enthalten weiterhin ca. 1% Aminosucker wie Galaktosamin, die in S.abortus equi-LPS nicht vorkommen. Diese sollten in weiteren Versuchen abgetrennt werden. Die bisher isolierten Präparate enthalten aufgrund der Radioaktivitäts-

messungen ca. 0,5 bis maximal 1% von solchen Substanzen, die aus den injizierten LPS-Präparaten stammen.

2.6.3. Gelpermeationschromatographie mit den löslichen Kotpräparaten

Wegen des nur gering veränderten Isotopenverhältnisses schien das radioaktive Präparat in Kot von Tag 1 und 2 bzgl. seines Molekulargewichtes noch so homogen zu sein, daß durch Gelpermeationschromatographie (Gelfiltration) die Abtrennung höher- oder niedermolekularer Substanzen möglich sein sollte. Versuche, das TEN-neutralisierte und lyophilisierte Präparat nach der Elektrodialyse wieder in Wasser zu lösen, ergaben neben gelöstem Überstand immer ein Sediment, in dem sich bis zu 20% der Radioaktivität befanden. Erst die Verwendung von Natriumlauroylsulfat (SDS) führte zur völligen Löslichkeit des radioaktiven Materials. Der dann noch vorhandene Rückstand enthielt in keinem Fall Radioaktivität. Deshalb wurde die Gelpermeationschromatographie in SDS-haltigem Puffer durchgeführt.

Wegen der Eigenschaft von SDS, Wasserstoffbrücken in wäßriger Lösung zu dissoziieren, sind nur solche Dextran- und Agarosegele in SDS-haltigen Puffern stabil, die chemisch quervernetzt sind (z.B. Sepharose-CL). Ebenso gegen SDS stabil sind Polyacrylamidgele, die u.a. bei Gelelektrophoresen verwendet werden. Wegen seines großen Trennbereiches für Proteine (zwischen 2×10^6 und 5000 (D)) und für Polysaccharide (zwischen 400×10^3 und 5000 (D)) wurde Sephacryl S300 ausgewählt. Ein für die Elektrophorese von Proteinen verwendeter Puffer (P1: 2% SDS, 2,5% Mercaptoäthanol und 5% Glycerin in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5) eignete sich zum Lösen des radioaktiven Kotextraktes, der Rückstand war nicht mehr radioaktiv.

2.6.3.1. Gelfiltration von löslichem ^{14}C -Rattenkotpräparat

Kotextrakt (ÜTEN) nach Elektrodialyse von ^{14}C -Rattenkot von Tag 2, 40-50 mg) wurde in 3-5 ml P1-Puffer gelöst (3 min, 100°C). Die Lösung wurde auf einer Sephacrylsäule S300 gelfiltriert (0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 0,1% SDS). Das typische Elutionsprofil einer Gelfiltration von Kotextrakt in SDS-haltigem Puffer ist in Abbildung XVI. zu sehen. Zum Vergleich wird das Elutionsprofil des injizierten Präparat 4 gezeigt, das unter den gleichen Bedingungen chromatographiert wurde. Beim Kotextrakt wurde die UV-Absorption des Eluates bei 280 nm, beim reinen LPS-Präparat der Brechungsindex beobachtet. Von allen Fraktionen wurden je 0,5 ml mit 5 ml Aquasol versetzt und auf Radioaktivität hin gemessen.

Bei der Gelfiltration von Kotextrakt wurden ein Peak im Ausschlußvolumen, zwei im Trennbereich und einer im Einschlußvolumen angezeigt. Nur in dem Peak, der als erster im Trennbereich eluiert wird, kann Radioaktivität gemessen werden. Die Radioaktivität erscheint in zwei überlappenden Peaks. Dies wurde auch beim injizierten LPS (Präparat 4) gefunden. Deshalb kann man annehmen, daß dieses Elutionsverhalten eine charakteristische Eigenschaft des injizierten LPS Präparates darstellt und nicht von in vivo-Veränderungen stammt.

Die Gelfiltration wurde mehrfach wiederholt. Die radioaktiven Fraktionen, die aus mehreren Gelfiltrationen (260 mg Ausgangspräparat) erhalten wurden, wurden gemeinsam durch Membranfiltration konzentriert und anschließend elektrodialysiert: Ausbeute (nach Neutralisation mit Natriumhydroxid) 92 mg. Dieses Material wurde auf Aminozucker und Protein untersucht (vergl. 2.6.2.5.): 24% Protein und 0,34% GlcN, kein meßbares Galaktosamin.

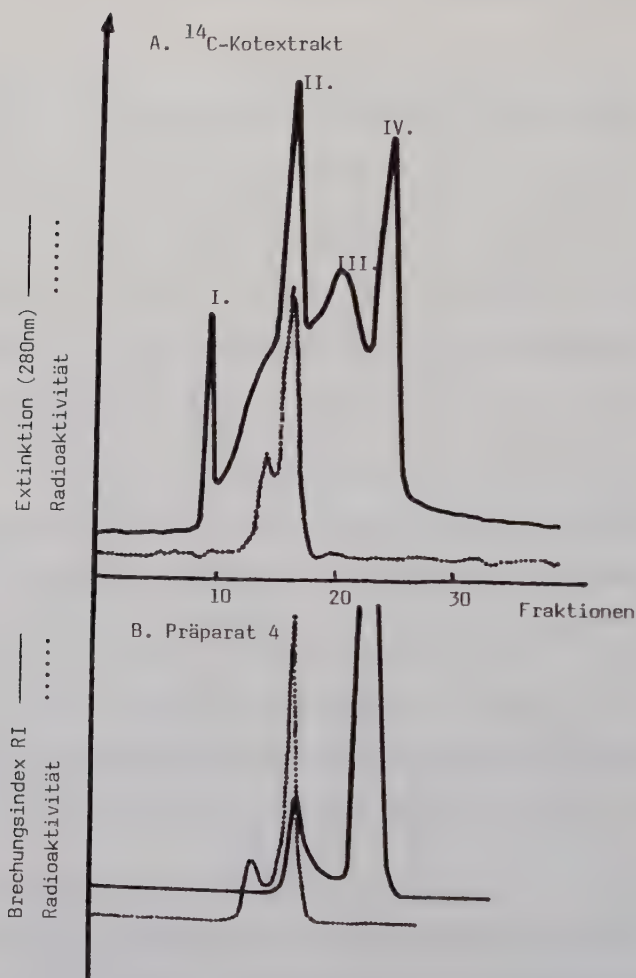


Abb. XVI. Gelpermeationschromatographie von löslichem ^{14}C -Rattenkotextrakt (Ü(TEN)) auf Sephacryl S300 (zum Vergleich das injizierte LPS-Präparat)

2.6.3.2. Gelfiltration von löslichem ^3H , ^{14}C -Rattenkotpräparat

Lösliches ^3H , ^{14}C -Kotpräparat (TEN-Überstand von Tag 1 aus 2.6.2.6.) wurde unter denselben Bedingungen wie in 2.6.3.1. chromatographiert, ebenso Präparat 5 (in der H^+ -Form eingesetzt). In beiden Fällen wird die Radioaktivität in nur einem Peak eluiert, beim Kotpräparat an der Stelle wie in 2.6.3.1., bei $\text{LPS}(\text{H}^+)$ etwas später (Abb. XVII.). Daneben wurde kein Aktivitätspeak gefunden. Das Isotopenverhältnis war auch hier unverändert.

2.6.3.3. Zusammenfassung und Diskussion der gelchromatographischen Ergebnisse

Anhand des Elutionsprofils bei 280 nm kann man sehen, daß ein Teil der Proteine durch Gelfiltration abgetrennt wird. Im elektrodialysierten Peak II sind noch 24 % Protein, d.h. es ist ca. 75 % des Proteins abgetrennt worden, an nicht radioaktivem GlcN sind sogar 90 % abgetrennt und die anderen Aminosucker sind nicht mehr meßbar.

Das radioaktive Präparat wurde im Trennbereich der Säule an der gleichen Stelle wie das injizierte LPS eluiert. Aus dem Vergleich mit einer Lösung von Dextranen mit Molmassen zwischen $4-35 \times 10^3$ (D) läßt sich für das eluierte Präparat ein ungefähres Molekulargewicht von $30-70 \times 10^3$ (D) abschätzen. Diese Molmasse ist niedriger als die für LPS (in der TEN-Form) aus dem Sedimentationskoeffizienten berechnete von 400×10^3 (D).

Für dieses niedrige Molekulargewicht ist das SDS verantwortlich, das die Mizellen von LPS auflöst (Oroszlan und Mora, 1963).

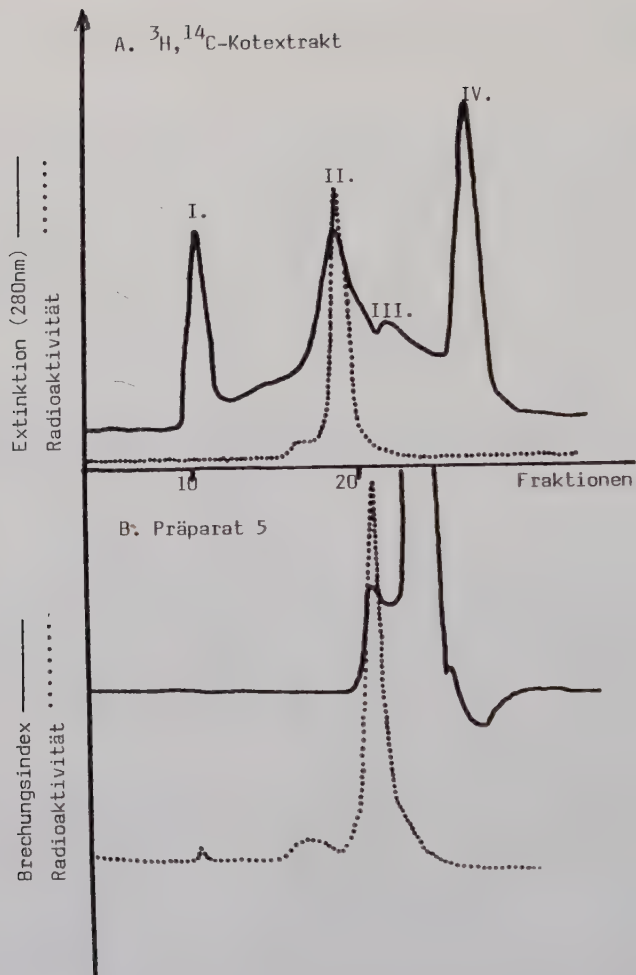


Abb. XVII. Gelpermeationschromatographie von löslichem ^3H , ^{14}C -Rattenkotextrakt (Ü(TEN)) auf Sephacryl S300 (zum Vergleich das injizierte LPS-Präparat)

2.6.4. Weitere vorläufige Untersuchungen an den gereinigten Präparaten

Die folgenden Versuche sollten aufzeigen, wie das angereicherte Kotpräparat weitergereinigt werden kann. Aufgrund der Anwesenheit von SDS lag das LPS in einer sehr wenig aggregierten Form vor. Durch die Entfernung des SDS (mittels Elektrodialyse) hofften wir, ein höheraggregiertes Präparat zu erhalten, das durch erneute Gelfiltration, diesmal ohne SDS von den anhaftenden Proteinen, Polysacchariden usw. zu trennen sei. Erste Versuche scheinen dem recht zu geben.

2.6.4.1. Erneute Gelfiltration der radioaktiven Peaks aus der SDS-Gelfiltration nach Entfernung von SDS

Sowohl Peak II aus 2.6.3.1. (Abb. XVI.) als auch aus 2.6.3.2. (Abb. XVII.) wurden nach Elektrodialyse über Sephacryl S300 gelfiltriert: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5. Das Elutionsprofil (Extinktion bei 280 nm) zeigt zwei bzw. drei Peaks (Abb. XVIII.). In beiden Versuchen wurde etwa 70% der Radioaktivität im Ausschlußvolumen eluiert, getrennt von dem größten Teil der Proteine, die übrigen 30% wurden in den anschließenden Fraktionen gefunden. Es ist noch nicht geklärt, ob der zweite radioaktive Peak von Veränderungen am LPS-Molekül herrührt oder ob noch vorhandenes SDS einen Teil des radioaktiven Präparates in einer niedermolekularen Aggregationsform hält. Der Hauptteil des radioaktiven Materials wurde als hochaggregiertes Präparat wiedergefunden (Ausschlußvolumen von Sephacryl S300 über 400×10^3 (D)).

2.6.4.2. Test auf O-Spezifität mit dem Säuleneluat aus 2.6.4.1

Die Anwesenheit von O-Antigen oder dessen Abspaltung läßt sich nicht aus der Radioaktivitätsmessung, auch nicht aus dem Isotopenverhältnis ablesen.

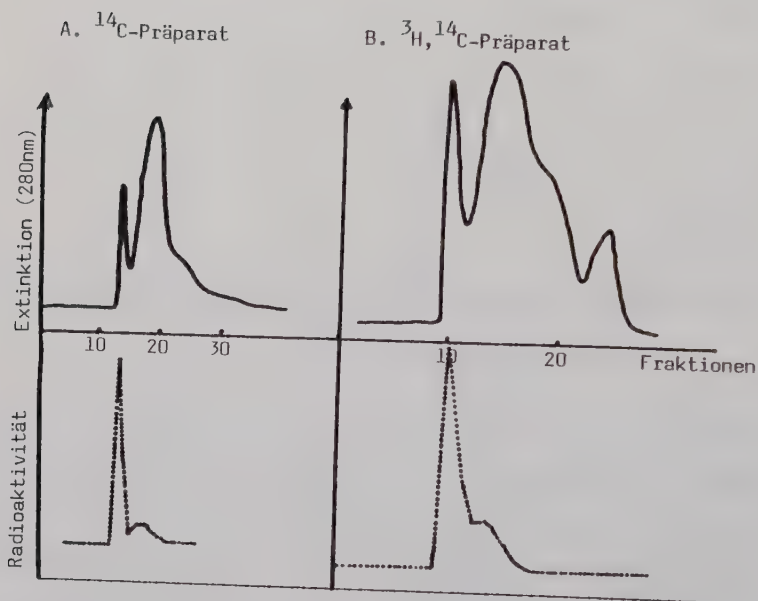


Abb. XVIII. Gelpermeationschromatographie der radioaktiven Fraktionen aus Abb. XVI. und XVII. nach erneuter Elektrodialyse und Neutralisation mit Natriumhydroxyd

Um die Anwesenheit von O-Antigen zu beweisen, kann man die charakteristischen Zucker der Polysaccharidkette chemisch analysieren oder serologisch - sehr empfindlich - die O-Spezifität testen.

Wegen der geringen Konzentration des radioaktiven Präparates ließ sich keine chemische Analyse durchführen. Deshalb wurde die Anwesenheit von O-Polysaccharid serologisch mit Hilfe der passiven Hämolysenhemmung bestimmt.

Alkali-behandeltes Lipopolysaccharid (LPS-OH) wurde auf Erythrozyten aufgezogen. Zwei hämolysische Einheiten von Anti-S.abortus equi-Antiserum wurden zu einer Verdünnungsreihe des Säuleneluates von 7.3.2 (12,5 µl in 12 Zweierstufen verdünnt) zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 15 Minuten wurden die mit LPS-OH-beladenen Erythrozyten und anschließend Meeresschweinchenkomplement zugegeben. Zum Vergleich wurde eine Verdünnungsreihe von LPS-OH untersucht. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Hemmung bestimmt.

Bei LPS-OH hemmten noch in diesem Test 19,6 ng, beim Eluat noch 2,4 CpM. Diese 2,4 CpM entsprechen 2 ng Ausgangsmaterial. Die passive Hämolysenhemmung ist keine exakt quantifizierbare Methode. Das Ausmaß der Hemmung wird wesentlich durch die Fähigkeit des zu untersuchenden Antigens beeinflusst, mit den Antikörpern zu reagieren. Durch die in vivo-Passage und die Aufarbeitungsschritte könnte die Antigenität des ausgeschiedenen Präparates gesteigert worden sein, wenn zusätzlich determinante Gruppen durch Depolymerisation freigesetzt wurden. Deshalb kann man feststellen, daß im isolierten Präparat sowohl die Radioaktivität als auch die O-Antigenität noch chemisch miteinander verbunden scheinen.

2.6.4.3. Erste Versuche, mittels Immunadsorption das radioaktive Präparat weiter anzureichern

Die Anwesenheit von O-Spezifität im eluierten Peak von 2.6.4.1. führte zu dem Versuch, mit Hilfe einer Anti-S.abortus equi-Immunsäule die Substanz weiter anzureichern.

2.6.4.3.1. Isolierung der Anti-S.abortus equi Antikörper und Herstellung der Immunsäule

Hydrazinolytiertes S.abortus equi-Lipopolysaccharid (LPS-hydraz., 30,1 mg) wurde mit einer Suspension von Glutardialdehyd-aktivierter AH-Sepharose 4B (3 mg in 150 ml PBS*) über Nacht geschüttelt. Dabei reagieren die durch Hydrazinolyse von den Fettsäuren befreiten Aminogruppen des GlcN mit den Aldehydgruppen des Glutaraldehyds. Nach Waschen mit Wasser wurde Äthanolamin (10 ml 1 M Lösung) an überschüssige Glutaraldehydreste gebunden. Anschließend wurde das Gel mit PBS gewaschen (S.abortus equi-Sepharose).

1,5 ml S.abortus equi-Sepharose wurden mit 55 mg Anti-S.abortus equi-IgG vom Kaninchen in 5 ml PBS inkubiert. Nach 1 Std. wurde das Präparat in eine kleine Säule gefüllt und bis zum Fehlen einer Extinktion bei 280 nm mit PBS gespült. Danach wurde mit Glycin/HCl-Puffer (0,1 M, pH 2,8) in vorgelegtes PBS (10-fach konzentriert) eluiert, bis die Extinktion wieder auf Null zurückgegangen war. Die Säule wurde anschließend mit PBS äquilibriert.

Das Glycin/HCl-Eluat wurde konzentriert und dialysiert (gegen PBS). Durch Hämolyse mit LPS-OH-beladenen Schafserythrozyten (vergl. 2.6.4.2.) und Meerschweinchenkomplement wurde kontrolliert, daß die desorbierten Antikörper noch Anti-S.abortus equi-Spezifität besitzen. Ebenso wurde der Überstand der Adsorption untersucht: 95% der Antikörperspezifität wurde adsor-

* PBS: Isotonischer Phosphat/Kochsalz-Puffer: 0,1% = 10 mMol Phosphat.

biert, die gereinigten Antikörper lysieren LPS-OH-Erythrozyten noch in einer Verdünnung von 1:2048. Die Anti-S.abortus equi-Antikörper wurden an 3,5 ml AH-Sepharose (über Glutardialdehyd) gekuppelt (vergl. oben, Kupplung von LPS- (hydraz.)).

2.6.4.3.2. Immunadsorption mit dem radioaktiven Peak aus 2.6.4.1.

Ein Teil des Säuleneluates von 2.6.4.1. (Peak 1, ^3H , ^{14}C -Präparat) wurde mit der Anti-S.abortus equi-Sepharose inkubiert. Die Suspension wurde in eine kleine Säule gefüllt. Nach Waschen mit PBS konnte im Überstand keine Radioaktivität mehr nachgewiesen werden. Anschließend wurde mit Glycin/HCl-Puffer eluiert, ohne daß Radioaktivität desorbiert werden konnte. Deshalb wurde anschließend mit 3 M Natriumthiocyanatlösung eluiert. Auch hier wurde das radioaktive Präparat nicht eluiert. Erst als wir mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,5, 0,1% SDS) eluierten, wurde ein Teil der Radioaktivität (ca. 25%) wieder freigesetzt.

2.6.4.4. Zusammenfassung des Kapitels 2.6.4.

Das durch Gelpermeationschromatographie vorgereinigte und elektrodialysierte, radioaktive Präparat ist durch erneute Gelfiltration ohne SDS weiter zu reinigen. Dabei liegt bis jetzt etwa ein Drittel des Präparates in einer anderen, niedermolekularen Aggregationsform vor als der Hauptteil des Präparates. Die Ursachen dafür sind noch nicht untersucht.

In der hochmolekularen Hauptfraktion ist noch S.abortus equi-Spezifität in einem ähnlichen Verhältnis zur Radioaktivität nachweisbar wie im einge-

setzten Präparat 4, d.h. O-Spezifität und GlcN-Radioaktivität, vor allem von Lipid A, sind anscheinend noch chemisch verbunden. Die Ausnutzung dieser Aktivität für Immunadsorptionsversuche scheiterte bisher an der hohen unspezifischen Affinität von LPS an Sepharose.

C. DISKUSSION

1. Präparate und Tiere

Das in vivo-Schicksal von Endotoxin ist bis heute nur unvollständig beschrieben. Durch die Verwendung isotoopenmarkierter Lipopolysaccharid-Präparate versuchte man seit langem, den Weg von Endotoxin im Tier zu verfolgen. Die früher meist verwendete Markierung mit ^{51}Cr -Chromat (Braude et al., 1955 und 1955a) hat den entscheidenden Nachteil, daß die in vivo-Stabilität des Endotoxin-Chromat-Komplexes nicht bekannt ist. Außerdem bestanden die damals als Endotoxin verwendeten Boivin-Extrakte nicht allein aus Lipopolysaccharid, sondern enthielten noch unterschiedliche Mengen an Protein. Das neuerdings von Ulevitch (1978) beschriebene, mit ^{125}J -Jod markierte Lipopolysaccharid trägt die Markierung im Kernoligosaccharid und im Lipoid A, wo sich freie Aminogruppen befinden (Äthanolaminsubstituenten), an die aromatischen Gruppe gekuppelt werden, die anschließend jodiert werden. Es muß bedacht werden, daß die Substitution von Lipoid A und Kernoligosaccharid mit Äthanolamin nicht vollständig ist. Ein jodiertes Lipopolysaccharid-Präparat ist daher heterogen hinsichtlich der markierten Lipopolysaccharid-Region, was die Interpretation der Ergebnisse erschweren kann. Das jodierte Präparat hat aber den Vorteil einer sehr hohen spezifischen Aktivität, noch Nanogrammmengen können wiedergefunden werden. Allerdings lassen sich mit diesem Präparat nur Abbauprodukte nachweisen, die aus Kern und/oder Lipoid A stammen. Ein für unsere Zwecke ideal markiertes Präparat sollte intrinsisch markiert sein, d.h. die Markierung ist in das Lipopolysaccharid eingebaut. Als einzubauende Isotope eignen sich ^3H und ^{14}C , sowie auch ^{18}O und ^{32}P .

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau von Radioaktivität in das Lipopolysaccharid von S.abortus equi-Bakterien mit Hilfe von Acetat als ^3H -Quelle und Glukose und N-Acetylglukosamin als ^{14}C -Quelle durchgeführt. Es wurden drei einfach markierte Lipopolysaccharid (LPS)-Präparate verwendet, bei denen jeweils eines der drei Substrate mit einem radioaktiven Isotop zum Kulturmedium zugegeben worden war. Ein viertes Präparat wurde aus Bakterien isoliert, denen alle drei Substrate angeboten worden waren. Die chemische Analyse der aus diesen Bakterien isolierten Lipopolysaccharide ergab, daß ^3H -Acetat ausschließlich zum Aufbau der Fettsäuren verwendet wurde, während ^{14}C -N-Acetylglukosamin (GlcNAc) und ^{14}C -Glukose (Glc) in das Lipid A-Gerüst (Diglukosamindisaccharid), die Fettsäuren und in O-Kette und Kern von LPS eingebaut wurden. Von dem angebotenen GlcNAc konnten, da im isolierten LPS weniger GlcN gefunden wurde als angeboten war, maximal nur 40% eingebaut worden sein. Tatsächlich wurden 6,3% gefunden, das ist ein Sechstel der theoretisch möglichen Ausbeute. Damit ist auch die spezifische Aktivität im Lipid A, bezüglich des GlcN, nur ein Sechstel von der des angebotenen GlcNAc. Demgegenüber ist die ^3H -Ausbeute aus Acetat unter 0,1%. Eine wesentliche Steigerung der Aktivität im Lipid A-Gerüst dürfte nur mit einem spezifisch höher markierten GlcNAc zu erreichen sein, da außer für die Lipid A-Biosynthese auch für den Aufbau von Murein große Mengen an GlcNAc verwertet werden. Deshalb erscheint die Ausbeute für GlcNAc (1/6 der maximal möglichen Menge) schon recht hoch. Eine höhere Aktivität der O-Kette und Kern sollte durch vermehrte Zugabe vor allem von radioaktiver Glukose oder von anderen, LPS-spezifischen Zuckern erreicht werden können, sofern letztere von den Bakterien aufgenommen werden.

Die bekannten, gut ausgearbeiteten Isolierungsverfahren für Lipopolysaccharid aus S.abortus equi machten es möglich, aus den relativ kleinen

Bakterienmengen in wenigen Isolierungsschritten wohl charakterisierte Präparate zu gewinnen. Die spezifische Aktivität des doppelmarkierten Präparates betrug $0,151 \times 10^6$ ^3H - und $1,34 \times 10^6$ ^{14}C -CpM. Im Gegensatz zu jodiertem Lipopolysaccharid ist die Markierung etwa tausendfach geringer. Für die Untersuchungen am Tier mußten daher relativ hohe Dosen injiziert werden. Wegen dieser, durch die geringe Aktivität geforderten LPS-Mengen wurden bisher nur LPS-unempfindliche Tierarten untersucht, denen ca. 5 mg LPS je kg Körpergewicht injiziert werden konnten. Diese Mengen sind für die Tiere toxisch, aber nicht letal. So konnte die Ausscheidung von radioaktiven Substanzen bis zu sieben Wochen lang studiert werden. Nur in den ersten vier bis fünf Tagen nach Injektion zeigten Meerkatzen und Ratten Krankheitssymptome. Bis auf eine Ratte, die starb, erholten sich die Tiere anschließend. Es wird in Zukunft wünschenswert sein, die Untersuchungen auch nach Injektion subtoxischer Dosen durchzuführen, allerdings müssen dazu höher markierte Präparate benutzt werden. Vielleicht können dann auch Untersuchungen an LPS-empfindlichen Säugetierspezies durchgeführt werden.

2. Die Ausscheidung in Urin und Kot

Es ist bekannt, daß im Gegensatz zu Normalurin, der selbst schon pyrogen ist, der Urin von Patienten mit Gram-negativer Infektion und der von LPS-vergifteten Tieren wesentlich stärker pyrogen ist (O. Westphal, persönliche Mitteilung). Deshalb vermutete man bisher, daß Lipopolysaccharid wenigstens teilweise über die Niere im Urin ausgeschieden wird. Diese Vermutung wurde bestärkt durch die Anwesenheit erhöhter Lipoid A-Spezifität im Urin von Meerkatzen nach Injektion von LPS, wobei Lipoid A im Hämolysehemmtest nachgewiesen wurde.

Nach Injektion radioaktiver LPS-Präparate wurden im Urin nur wenige Prozent der injizierten Dosis gefunden, zwischen 3 und 5 % bei Meerkatzen bzw. Ratten innerhalb von zwei Wochen. Obwohl einmal Meerkatzen, einmal Ratten untersucht wurden, obwohl außerdem LPS-Präparate injiziert wurden, die sich in der Markierung der LPS-Regionen unterschieden, konnten deutliche Parallelen zwischen den verschiedenen Experimenten beobachtet werden. Nach Injektion von ^{14}C -markiertem LPS, sei es mit Glc, sei es mit GlcNAc, sei es zusätzlich ^3H -markiert, verläuft die Ausscheidung von ^{14}C im Urin gleichförmig: Es wird ein Aktivitätspeak an Tag 1 nach Injektion beobachtet. Dagegen zeigt die ^3H -Ausscheidung sowohl nach dem einfach markierten Präparat, aber auch nach dem doppelmarkierten Präparat, also unabhängig von der ^{14}C -Ausscheidung, keinen solchen Peak an Tag 1. Hier scheint die Ausscheidung vom Urinvolumen abhängig, denn ab Tag 4 gilt: Je mehr Urin ausgeschieden wird, desto höher ist die pro Tag ausgeschiedene ^3H -Menge. Dies gilt vor allem für Meerkatzenurin. Die insgesamt geringe Ausscheidung an Radioaktivität im Urin führte dazu, von den Ratten auch den Kot zu untersuchen. Hier wurden bis zu 60% (^{14}C) und 43% (^3H) der injizierten Aktivität im Verlauf von sieben Wochen wiedergefunden. Die Kinetik der Ausscheidung verläuft für beide Isotope gleichförmig: Sie nimmt von Tag 1 nach Injektion an ständig ab. An Tag 1 werden etwa 15%, nach sieben Wochen nur noch 0.2% der injizierten Aktivität pro Tag ausgeschieden (^{14}C). Im Verlauf der sieben Wochen wird im Verhältnis zu ^{14}C immer weniger Tritium ausgeschieden, so daß nach sieben Wochen ca. 60% an ^{14}C , aber nur 43% an ^3H im Kot ausgeschieden sind. Aus dem Verlauf der Kurve für die Gesamtausscheidung (Abb. XIV), die sich asymptotisch abflacht, kann man schließen, daß es einen Grenzwert für die Ausscheidung im Kot gibt. Dieser liegt für die ^3H -Ausscheidung bei etwa 45%, für die ^{14}C -Ausscheidung bei etwa 65% der injizierten Radioaktivität. Da auch im Urin immer

geringere Mengen an Radioaktivität ausgeschieden werden, sind nach sieben Wochen etwa 50% der ^3H -Aktivität und 30% der ^{14}C -Aktivität noch im Organismus verblieben oder auf anderen Wegen als über Urin und Kot aus dem Organismus ausgeschieden worden.

Ein Versuch zur Bilanz der Ausscheidung von LPS aus dem Organismus soll im Anschluß an die Ausführungen über die ausgeschiedenen Substanzen gemacht werden.

3. Untersuchungen an den ausgeschiedenen Substanzen

Die in Urin und Kot ausgeschiedenen radioaktiven Substanzen wurden daraufhin untersucht, ob es sich noch um intaktes Lipopolysaccharid handelt oder ob Veränderungen gegenüber dem injizierten LPS feststellbar sind. Dabei wurden bisher die Dialysierbarkeit der Proben und ihr Verhalten bei Gelpermutationschromatographie untersucht. Ein wichtiges Hilfsmittel, um Aussagen über Veränderungen an LPS zu machen, ist die Doppelmarkierung, vor allem Änderungen des $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Isotopenverhältnisses im doppelmarkierten LPS. Wie schon erwähnt, sind in diesem LPS-Präparat allein die Fettsäuren ^3H -markiert, während sich die ^{14}C -Isotope ungleichmäßig über das gesamte LPS-Molekül verteilen: 85% im Lipoid A-Gerüst, 12% in O-Kette plus Kern und 3% in den Fettsäuren. Jede Veränderung des Isotopenverhältnisses gegenüber dem ursprünglichen Wert von 7,3 zeigt eine in vivo-Degradation von LPS an: Erhöhung bedeutet Fettsäuresabspaltung, Erniedrigung kann bedeuten

- a) Abspaltung von O-Antigen und Kern (bei vollständiger Abspaltung würde ein Quotient von 6,7 erreicht, der dem Wert für freies Lipoid A entspricht) oder
- b) Anreicherung von abgespaltenen Fettsäuren oder deren Abbauprodukten, wenn ein Quotient auftritt, der niedriger ist als 6,7. Reine Fettsäuren würden einen Wert von etwa 0,3 besitzen (vgl. Tabelle 7).

3.1. Untersuchungen des Urins

Im Rattenurin findet man an Tag 1 nach Injektion eine Erhöhung des Isotopenverhältnisses auf 11,4, an Tag 2 ein Absinken auf 2,2. Von Tag 2 an steigt das Isotopenverhältnis wieder an und erreicht nach 8 Tagen einen Wert von 10,7.

Die ^3H -Aktivität in diesen Urinproben ist ab Tag 1 zu mehr als 70% an dialysierbare Substanzen gebunden. An Tag 1 wurde in den getrockneten Dialyseprodukten die gesamte Tritiumaktivität wiedergefunden. Dagegen sind von Tag 2 an 90% und mehr der ^3H -haltigen Substanzen flüchtig. Der restliche, nicht flüchtige Anteil ist weitgehend dialysierbar.

Bei der Destillation von Urin wurde der flüchtige Tritiumanteil zusammen mit Wasser aufgefangen. Deshalb nehmen wir an, daß das Tritium in Urin von Tag 2 an als Wasser ausgeschieden wird. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, daß die ^3H -enthaltenden Substanzen in Meerkatzenurin ebenfalls flüchtig sind und daß die Höhe der ^3H -Ausscheidung von der Urinmenge abhängig ist. Die Kurven für die radioaktive Ausscheidung und für das Urinvolumen verlaufen gleichförmig (Abb. VIII).

Denn wenn das Tritium als ^3H -Wasser freigesetzt worden ist, sollte es in vivo über den ganzen Organismus verteilt werden. Der Anteil des ausgeschiedenen Tritiums am gesamten ^3H -Wasser entspricht dann dem Anteil der Urinmenge an der gesamten Flüssigkeitsmenge des Körpers.

Als weitere Bestätigung für das Vorliegen von Tritium in Form von Wasser kann man auch den Verlauf der spezifischen Aktivität in Meerkatzenurin heranziehen: Bis zum Tag 4 steigt die Kurve an, danach fällt sie langsam

wieder ab (Abb. VIII). Solange die Tiere krank sind, weniger trinken und weniger Urin ausscheiden, reichert sich das ^3H -Wasser in der Körperflüssigkeit an; die normale Aufnahme von Wasser nach Gesunden der Tiere und die damit verbundene erhöhte Urinausscheidung führt zur Verdünnung der Radioaktivität, und die spezifische Aktivität in der Körperflüssigkeit (pro/ml) und damit auch im Urin nimmt langsam wieder an.

Das im Urin ausgeschiedene ^3H -Wasser muß aus den Fettsäuren des injizierten Lipopolysaccharides stammen. Offensichtlich werden die Fettsäuren enzymatisch freigesetzt und anschließend abgebaut. Das Ausmaß der enzymatischen Degradation von LPS wird in einem späteren Abschnitt abgeschätzt. Dabei wird dann auch berücksichtigt, daß das ^3H -Wasser nicht nur im Urin ausgeschieden werden kann, sondern auch mit der Atemluft ausgeatmet oder über die Haut ausgeschwitzt wird.

Die im Urin ausgeschiedene ^{14}C -Aktivität ist nicht an flüchtige Substanzen gebunden. Hier wurde die im Urin vorhandene Radioaktivität nach der Dialyse in den getrockneten, hoch- und niedermolekularen Fraktionen (Retentat bzw. Dialysat) wiedergefunden. Das Isotopenverhältnis im Dialysat von Tag 1 zeigt einen Wert von 15,4. Für eine einheitliche Substanz würde das bedeuten, daß etwa 50% aller Fettsäuren abgespalten worden sind. Ob ein solches Lipoid A-OH oder LPS-OH dialysierbar ist, das noch drei bis vier seiner ursprünglich sieben Fettsäuren trägt, ist unwahrscheinlich, da es in einer Aggregationsform mit mehreren Molekülen pro Mizelle vorliegen sollte. Man könnte aber auch annehmen, daß sich im Dialysat von Tag 1 zwei radioaktive Substanzen befinden, von denen die eine vor allem ^3H -markiert ist (ein Produkt des Fettsäureabbaus, das nicht Wasser ist), während die zweite vor allem ^{14}C -

markiert ist (ein Abbauprodukt der O-Kette, siehe unten). Die Annahme eines ^3H -markierten Produktes des Fettsäureabbaus in Rattenurin, das nicht Wasser ist, stimmt mit der Beobachtung überein, daß in ^3H -Meerkatzenurin

a) nicht die ganze Radioaktivität flüchtig ist und

b) bei Gelfiltration niedermolekulare Fraktionen mit Molmassen von 350 -150 (D) gefunden wurden.

Nach Tag 1 enthält der Rattenurin solche radioaktiven Substanzen (außer ^3H -Wasser), die aufgrund des Isotopenverhältnisses von 70% und mehr des Tritiums befreit sind. Von Tag 2 an sind diese Substanzen zu etwa $3/4$ dialysierbar (Diffusionsgrenze bei 10 000 (D)). Intaktes Lipopolysaccharid aus S.abortus equi hat eine Molmasse von etwa 20000 (D) (Galanos, 1975); deacyliertes LPS ist daher mit einer Molmasse von etwa 15 000 (D) ebenfalls nicht dialysierbar. Aufgrund der Dialysierbarkeit der ^{14}C -Ausscheidungsprodukte, die fast kein Tritium enthalten, vermuten wir, daß nach der Fettsäureabspaltung das deacylierte Lipopolysaccharid weiter abgebaut werden kann. Welche Bruchstücke dabei entstehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Den Radioaktivitätsmessungen zu widersprechen scheint das Auftreten von Lipoid A-Spezifität im Urin von Tag 1 oder 2. Die Proben sollten aufgrund des Isotopenverhältnisses kein intaktes Lipoid A enthalten. In Urin wurde jedoch erst nach saurer und alkalischer Hydrolyse serologisch Lipoid A-Spezifität* gefunden (Ch. Galanos, persönliche Mitteilung). Unter diesen Bedingungen

* Lipoid A-Spezifität bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die passive Hämolyse Lipoid A-beladener Erythrozyten (mit Hilfe von Anti-Lipoid A-Antiserum und Komplement) gehemmt wird, weil die Substanzen mit Lipoid A-Spezifität die Antikörper vollständig binden, so daß keine Lipoid A-OH/Anti-Lipoid A-Antikörper-Komplexe mehr auf der Erythrocytenoberfläche gebildet werden können, welche mit Hilfe von Komplement zur Erythrocyten-Lyse führen - was in diesem Fall also spezifisch gehemmt wird.

wird a) die Polysaccharid(-dOclA)-Lipoid A-Bindung gespalten (vgl. Abb. III) und werden b) estergebundene Fettsäuren von Lipoid A abgespalten. Aus Abbauprodukten von LPS, wie sie im Urin vorkommen, könnten nach dieser Behandlung z.B. ein Di-glukosamin- oder sogar ein Mono-glukosaminrest mit einem D-3-Hydroxy-myristinsäurerest entstanden sein, und solche wasserlöslichen Produkte würden aufgrund einer serologischen Kreuzreaktion (C. Galanos, persönliche Mitteilung) die passive Hämolyse ebenso hemmen wie Lipoid A. Aus dem Isotopenverhältnis von 30 für die an Tag 1 ausgeschiedene, hochmolekulare Fraktion (dort wurde die höchste Lipoid A-Spezifität gefunden) kann man schließen, daß vier bis fünf der sieben Fettsäuren abgespalten wurden. Rückschlüsse auf die Anwesenheit von intaktem Lipoid A kann man aus dem serologisch bestimmten Lipoid A-Gehalt daher nicht ziehen.

Wie in der Einleitung erwähnt, wird die Pyrogenität von Lipoid A durch Fettsäureabspaltung stark vermindert. Die in Urin gefundenen Substanzen sind weitgehend deacyliert. Dennoch weiß man, daß der Urin LPS-vergifteter Tiere ebenso wie der von Patienten mit Gram-negativer Infektion verstärkt pyrogen ist (O. Westphal, persönliche Mitteilung). Dafür kann man sich zwei Erklärungen vorstellen: Die minimale pyrogene Dosis (MPD) liegt bei 0.1 ng LPS (Kaninchen, i.v. injiziert). Bei einer spezifischen Aktivität von 30 CpM/ml im Meerkatzenurin nach Präparat 2, das sind etwa 1 µg LPS/ml, und von 1330 CpM/ml im Rattenurin nach Präparat 4, das sind etwa 0,2 µg LPS/ml, könnten neben deacyliertem Lipopolysaccharid noch wenige % an intaktem oder weitgehend intaktem LPS vorhanden sein, die dann für die Pyrogenität verantwortlich wäre. Es könnten aber auch die Substanzen, die schon den Urin gesunder Säugetiere pyrogen machen (möglicherweise Peptide und andere Abbauprodukte), nach Lipopolysaccharid-Injektion verstärkt freigesetzt werden.

3.2. Untersuchungen an Kot

Die bisherigen Untersuchungen an Kotproben zeigen, daß nach Injektion von doppelmarkiertem LPS die im Kot ausgeschiedenen Substanzen in der ersten Woche nach Injektion zu weniger als 1% dialysierbar sind. Das Isotopenverhältnis ist dem des injizierten Präparates noch sehr ähnlich. Im Verlauf von sieben Wochen steigt es jedoch langsam an. Der Wert von 30, der nach sieben Wochen erreicht ist, bedeutet, daß von sieben Fettsäuren des LPS-Moleküls vier bis fünf abgespalten sind.

Die Annahme, daß die radioaktive Substanz im Kot an Tag oder 2 noch weitgehend intaktes LPS ist, wurde dadurch gestützt, daß in einem angereicherten Präparat die Anwesenheit von O-Spezifität, von der man annehmen kann, daß sie wie die Radioaktivität aus dem injizierten Präparat stammt, mit Hilfe des Hämolyse-Hemm-Testes bewiesen wurde. Außerdem verhält sich die Substanz bei der Anreicherung wie LPS: Sie wurde durch Elektrodialyse und Neutralisation mit Triäthylamin (TEN) in löslicher Form aus Kot freigesetzt und durch zweifache Gelpermeationschromatographie angereichert. In Gegenwart eines Detergenz (SDS) wird sie wie das injizierte Präparat im Bereich von 70-50000 (D) auf einer Sephacryl S300-Säule eluiert. Nach Entfernung des Detergenz (durch erneute Elektrodialyse) wurde nach Neutralisation mit Natriumhydroxyd der überwiegende Teil der Substanz bei einer zweiten Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S300, ohne SDS) im Bereich über 400000 (D) gefunden. Der Versuch, durch Ausnutzung der O-Spezifität eine weitere Anreicherung mit Hilfe einer Immunadsorbenssäule zu erreichen, führte bisher zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

3.3. Der Verbleib des injizierten Lipopolysaccharides - Versuch einer Bilanz

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen allein lässt sich keine Bilanz aufstellen, die den Verbleib von Lipopolysaccharid in vivo vollständig beschreibt. Es fehlen die Zahlen über die nicht in Kot und Urin ausgeschiedenen radioaktiven Substanzen. Deshalb müssen andere Ergebnisse mit in die Betrachtung einbezogen werden.

In einem ersten Versuch wurde zusammen mit Frau Dr. M.A. Freudenberg AS2-Ratten doppelmarkiertes LPS (Präparat 5 mit Präparat 1 verdünnt) injiziert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden Ratten auf die Verteilung der Radioaktivität in den getrockneten Organen hin untersucht. Die größte Menge, 75% der Radioaktivität (nach 24 Stunden), wurde in der Leber gefunden, weitere 5% in der Milz. In den übrigen Organen wurden keine größeren Beträge an Radioaktivität (nach Trocknung) gefunden. Nach 26 Tagen betrug die ^{14}C -Aktivität in der Leber nach 35% bzw. 26% der injizierten Gesamtdosis (Isotopenverhältnis 13,3) und in der Milz 4,5% (Isotopenverhältnis 12,9).

Zusammen mit der Ausscheidung in Urin und Kot (anhand dieser Arbeit) beträgt die Wiederfindungsrate für die ^{14}C -Markierung etwa 90-95% (Kot, Urin, Leber und Milz). Der Verbleib von Lipopolysaccharid scheint damit aufgeklärt zu sein: Das injizierte LPS wird hauptsächlich in Leber und Milz gesammelt und erst schnell, später immer langsamer im Kot ausgeschieden. Dabei wird das Lipopolysaccharid mit der Zeit deacyliert. Das Isotopenverhältnis von 30 nach sieben Wochen heißt, daß noch etwa 2 von 7 Fettsäuren vorhanden sind. Man könnte vermuten, daß es sich dabei um die amidgebundenen D-3-Hydroxy-myristinsäurereste handelt, dafür gibt es aber keine Beweise. Andererseits bleibt die Deacylierung nicht auf der Stufe eines nur

von den estergebundenen Fettsäuren befreiten LPS-OH stehen, wie das Isotopenverhältnis in der hochmolekularen Fraktion des Urins an Tag 4 zeigt: Ein Quotient von 47 bedeutet, daß nur noch eine von sieben Fettsäuren anwesend ist.

Die Tatsache, daß die abgespaltenen Fettsäuren zu Wasser abgebaut werden, erschwert die Aufstellung einer Bilanz für die ^3H -Markierung. Es gibt zwar in der Literatur einige Angaben zum Wasserhaushalt der Ratte, aber im Endotoxin-behandelten Tier sind viele normale Regulationsmechanismen gestört, so daß z.B. die in der Literatur angegebene Halbwertszeit von 3,3 Tagen für den Verbleib von Wasser in der Ratte (Thompson, 1952) nur sehr vorsichtig zu gebrauchen ist. Dennoch soll versucht werden, mit weiteren Angaben eine Abschätzung über die ^3H -Bilanz zu treffen: Eine ausgewachsene männliche Ratte wiegt im Durchschnitt 250 g. Davon sind etwa 60-70% Wasser, also etwa 150 ml Wasser pro Tier (aus: Biology Data Book II. Ed., 1974; Altmann und Dittmer (Hrsg.)). Die Halbwertszeit von 3,3 Tagen heißt, daß in drei Tagen etwa 75 ml ausgetauscht werden, ohne Berücksichtigung der exponentiellen Skala also etwa 25 ml Wasser pro Tag. Davon werden ca. 5 ml im Urin ausgeschieden, der Rest von 20 ml über die Atemluft und die Haut. Die im Urin gemessenen Tritiumkonzentrationen gelten bei Gleichverteilung des ^3H -Wassers auch im übrigen Organismus. Mit diesen Zahlen und unter der Annahme der Gleichverteilung des tritiierten Wassers kann man die Gesamtkonzentration an ^3H -Wasser an den ersten Tagen nach Injektion abschätzen und aus der gemessenen Urinausscheidung auf die tägliche Zunahme des ^3H -Wassers durch Abspaltung und Abbau weiterer Fettsäuren schließen (Tabelle 26).

(Beispiel: An Tag 2 (Spalte 1) beträgt die ^3H -Aktivität im Urin 184 CpM/ml (Spalte 2), insgesamt wird von jeder Ratte im Mittel $1,6 \times 10^3$ CpM im Urin ausgeschieden (Spalte 3; vgl. Tabelle 11). In 20 ml Wasser, die nach der obigen

Tabelle 26. Berechneter Abbau der Fettsäuren zu Wasser während der ersten Tage nach Injektion von doppelmarkiertem S.abortus equi-LPS

(1) Tag nach LPS	(2) ^3H -CpM/ml	(3)		(4)		(5)		(6)		(7)	
		Ausscheidung über		tägliche aus Fettsäuren abgebaut		tägliche aus Fettsäuren abgebaut		in der gesamten Körperflüssigkeit		täglich ausgeschieden	
		Urin	CpM($\times 10^{-3}$)	Atem und Haut	CpM($\times 10^{-3}$)	CpM($\times 10^{-3}$)	berechnet	CpM($\times 10^{-3}$)	berechnet	CpM($\times 10^{-3}$)	berechnet
	gemessen	gemessen		berechnet		berechnet		berechnet		berechnet	
1	84	1,6		a)							
2	118	1,5		2,36		17,7		17,7		3,96	
3	184	1,65		3,68		13,8		27,6		5,3	
4	212	1,3		4,24		9,5		31,8		5,5	
5	190	1,4		7,6		2,3		28,6		9,0	
6	110	0,4		4,3		(-3,1)		16,5		4,6	

a) noch keine flüchtigen radioaktiven Substanzen als ^3H -Wasser meßbar

(Erläuterung siehe im Text)

Annahme über Haut und Atem ausgeschieden werden, sind weitere (20×184) $3,7 \times 10^3$ CpM (Spalte 4). Zusammen werden $5,3 \times 10^3$ CpM ausgeschieden (Spalte 7). Die Gesamtaktivität in den angenommenen 150 ml Körperflüssigkeit beträgt (150×184) $27,6 \times 10^3$ CpM an Tag 3, am nächsten Tag 4 aber $31,8 \times 10^3$ CpM (Spalte 6). $5,3 \times 10^3$ CpM werden an Tag 3 ausgeschieden, zu den verbleibenden ($27,6 - 5,3$) $22,3 \times 10^3$ CpM müssen $9,5 \times 10^3$ CpM (Spalte 5) durch weiteren Abbau von Fettsäuren hinzukommen, damit die für Tag 4 berechnete Gesamtaktivität von $31,8 \times 10^3$ CpM erreicht wird.

Von den pro Ratte injizierten 215×10^3 H-CpM sind danach bis Tag 3 $36,8 \times 10^3$, also 17% abgespalten (etwa eine Fettsäure von sieben). Zu 17% addieren sich aber auch die Beträge, die a) an dem in Kot ausgeschiedenen LPS schon fehlen (2.6%) und die b) von dem in der Leber an Tag 3 bestimmten LPS abgespalten sind (15%, Berechnung über das Isotopenverhältnis). Man kommt also sowohl bei der Abschätzung aufgrund der radioaktiven Konzentration im Urin als auch durch die Berechnung des fehlenden Tritiumanteiles aufgrund des Isotopenverhältnisses zu den gleichen Ergebnissen. Die Annahmen von 150 ml Wasser im gesamten Organismus und von 20 ml Ausscheidung pro Tag durch Atemluft und Haut sind allerdings nur annäherungsweise richtig, sie berücksichtigen nicht, daß der Stoffwechsel der Ratten durch die hohe LPS-Dosis gestört ist. Auch geht in die Berechnung nicht ein, daß das ^3H -Wasser auch mit für den Aufbau von Substanzen verwendet werden kann, wodurch sich der Aufenthalt im Organismus verlängert. Daß es sich nur um eine grobe Abschätzung handelt, erkennt man auch daran, daß rechnerisch nach sieben Tagen keine Fettsäuren mehr abgebaut werden dürften, der berechnete Zuwachs ist negativ, obwohl man feststellen kann, daß sich das Isotopenverhältnis in Leber, Kot und den nichtflüchtigen Substanzen im Urin auch weiterhin erhöht, also daß Fettsäureabbau stattfindet. Dennoch läßt diese Aufstellung Schlüsse auf die Menge des abgespaltenen Tritiums zu: Aus

Tabelle 26 geht hervor, daß nach 6 Tagen schon ca. 24% der injizierten Fettsäuren zu Wasser abgebaut sein sollten. Im Vergleich dazu sind nach 26 Tagen von dem in Leber und Milz verbleibenden LPS 13,2% und von dem bis zu Tag 21 ausgeschiedenen LPS 13,7% abgebaut, zusammen also 27% des Tritiums. Für Tag 6 fehlen entsprechende Zahlen noch. Innerhalb der Genauigkeit, mit der man diese Werte abschätzen kann, und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der eine Wert aus der vierten Woche, der andere aus der ersten Woche nach Injektion stammt, stimmt der geschätzte Wert mit dem gemessenen relativ gut überein. Man kann deshalb annehmen, daß im Mittel wenigstens 30%, also zwei von sieben Fettsäuren, im Laufe der Zeit abgespalten wurden, wobei bei den zuerst ausgeschiedenen Proben (fast) keine, später bis zu 6 (Urin) bzw. 5 (Kot) von sieben Fettsäuren abgespalten worden sind.

4. Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit anderen Untersuchungen zum in vivo-Schicksal von Lipopolysaccharid

Aus den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen geht hervor, daß die LPS-unempfindlichen Meerkatzen und Ratten zur Abspaltung der Fettsäuren von LPS und damit zu einer enzymatischen Detoxifizierung befähigt sind. Für einen solchen Abbau verantwortliche Enzyme, Arylesterasen, sind in den mit LPS komplexierenden Serumkomponenten β_1 -Lipoprotein (Skarnes, 1966) und HDL (Freudenberg et al., 1980) beschrieben worden. Bislang konnte eine enzymatische Abspaltung von Fettsäuren im Serum jedoch nicht mit Sicherheit bewiesen werden. Es wurde sogar gezeigt, daß der Komplex von Endotoxin mit Lipoprotein durch Pronasebehandlung oder Polysulfatglukose unter Erhaltung der Toxizität des Endotoxins dissoziiert werden kann (Oroszlan et al., 1966; Rudbach und Johnson, 1964).

Dagegen wurde eine Detoxifizierung durch die Leber (und die Milz) von Rutenberg et al. (1967) beobachtet. Nach Injektion einer letalen Dosis von Endotoxin in eine mesenterische Vene von Kaninchen konnten diese Autoren zeigen, daß 85% der Versuchstiere überlebten, während nach Injektion in eine Ohrvene oder Nierenarterie nur 15% überlebten. Im ersteren Fall muß das Endotoxin zuerst die Leber passieren, bevor es in den übrigen Organismus gelangt, in den beiden anderen Fällen verteilt sich Endotoxin im Organismus, ohne daß es vorher in der Leber abgefangen werden kann. Die Autoren schlossen aus diesem Versuch, daß Endotoxin in der Leber detoxifiziert wird. Ob Endotoxin aus der Leber wieder herausgelangen kann, ist noch nicht beschrieben.

Daß die Leber eine zentrale Rolle bei der Reinigung des Blutes von Endotoxin spielt, ist seit den Arbeiten von Braude et al. (1955a) immer wieder bestätigt worden. In jüngster Zeit fanden M.A. Freudenberg und Ch. Galanos (in Vorbereitung), daß die Kupffer'schen Sternzellen in der Leber - dabei handelt es sich um Makrophagen - die ersten Zellen sind, in denen sich LPS nach i.v.-Injektion nachweisen läßt. Später wird LPS auch in den Hepatozyten gefunden. Eine Eliminierung von dort in die Gallenkapillaren würde zu der in dieser Arbeit gefundenen Ausscheidung von LPS im Kot führen.

Der Ort der LPS-Deacylierung könnte sich einmal in den Kupfferzellen, zum anderen in den Hepatozyten befinden. Von den ersteren könnte das schnell deacylierte LPS wieder ins Blut gelangen und wird durch die Niere im Urin ausgeschieden, während das von Hepatozyten nur langsam deacylierte LPS vollständig oder zum überwiegenden Teil im Kot eliminiert würde. Mit der Annahme von zwei unterschiedlich schnell ablaufenden, unabhängigen Mechanismen könnte man erklären, warum aufgrund des Isotopenverhältnisses gleichermaßen deacyliertes LPS an Tag 1 im Urin, in der siebten Woche nach

Injektion aber im Kot ausgeschieden wird. Weitere Versuche, die zu einem vollständigeren Bild von den Vorgängen nach LPS-Injektion führen, sind in unserer Arbeitsgruppe geplant.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen an Urin und Kot von Meerkatzen und Ratten, denen radioaktiv markierte Lipopolysaccharid-Präparate aus Salmonella abortus equi (LPS) injiziert worden waren, erlaubten Aussagen über die Eliminierung von LPS und einen enzymatischen in vivo-Abbau dieses Lipopolysaccharides durch diese gegenüber LPS-unempfindlichen Tiere.

1. Die verwendeten Präparate waren so markiert, daß die Fettsäuren des LPS jeweils ^3H -markiert waren, während ^{14}C -Isotope vor allem in das Lipid A-Diglukosamindisaccharid, daneben auch in den übrigen Regionen von LPS eingebaut waren.
2. Der überwiegende Teil der ^{14}C -Radioaktivität wird über den Kot ausgeschieden. Dabei nimmt die tägliche Menge von 15% der injizierten Dosis an Tag 1 nach Injektion auf 0.2% pro Tag in der siebten Woche stetig ab. Insgesamt wurden 60% der injizierten ^{14}C -Aktivität, d.h. des Polysaccharids und des Lipid A-Diglukosamingerüsts im Kot wiedergefunden.
3. Der Anteil der ^3H -Aktivität im Kot nimmt im Verhältnis zur ^{14}C -Aktivität im Laufe von sieben Wochen ständig ab: Während an Tag 1 das Verhältnis von ^3H zu ^{14}C noch gleich dem im injizierten Präparat ist, ist es nach sieben Wochen auf ein Fünftel des ursprünglichen Wertes gesunken. Daraus wurde geschlossen, daß vier bis fünf der ursprünglich sieben Fettsäuren vom Lipopolysaccharid abgespalten wurden. Insgesamt wurden nach sieben Wochen 43% der injizierten ^3H -Aktivität im Kot wiedergefunden.

4. Im Urin wurden nur 3 - 5 % der injizierten ^3H - und ^{14}C -Aktivität wiedergefunden. Aus dem Verhalten der radioaktiven Substanzen im Urin wurde geschlossen, daß die Fettsäuren, die vom LPS abgespalten worden sind, bis auf die Stufe von ^3H -Wasser abgebaut werden. Auch das deacylierte Polysaccharid wird teilweise in kleinere Einheiten abgebaut. Das Isotopenverhältnis in den im Urin ausgeschiedenen Substanzen und auch deren Verhalten bei Dialyse und Äthanol-fällung lassen darauf schließen, daß intaktes Lipopolysaccharid entweder gar nicht, oder nur zu einem geringen Bruchteil im Urin ausgeschieden wird. Die früher gefundene erhöhte Pyrogenität im Urin Endotoxin-behandelter Tiere kann man auch auf andere Vorgänge zurückzuführen.
5. Aus der Konzentration des radioaktiven Wassers im Urin an den verschiedenen Tagen wurde der gesamte Abbau der Fettsäuren von LPS abgeschätzt. Wenigstens 30% aller Fettsäuren werden im Laufe der Zeit abgespalten und zu Wasser abgebaut.
6. Eine Anreicherung der ausgeschiedenen Substanzen gelingt aus Kot mit Hilfe von Elektrodialyse und Gelpermeationschromatographie. Das isolierte Präparat von Tag 1 und 2 nach Injektion besitzt ^3H und ^{14}C im gleichen Verhältnis wie das injizierte LPS, d.h. keine Veränderungen am Lipid A sind meßbar. Die O-Spezifität - charakteristisch für das O-Polysaccharid - scheint noch mit der Radioaktivität verbunden zu sein.

E. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Züchtung der Bakterien und Gewinnung von radioaktiv markiertem Lipopolysaccharid

Für alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Bakterien der Spezies Salmonella abortus equi verwendet. Der Stamm 1301 (Wildtyp) wird im Max-Planck-Institut in Freiburg (MPI Freiburg) auf Eiagar gehalten. Die LPS-Präparate 1-4 wurden von Dr. Galanos (MPI Freiburg) zur Verfügung gestellt.

1.1. Gewinnung von ^3H , ^{14}C -Lipopolysaccharid (Präparat 5)

Die Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 ml Standard I-Nährmedium (Merck) mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bebrütet. Mit der Übernachtskultur wurde 1 ltr Standard I-Medium beimpft. Insgesamt vier 1 ltr-Kulturen enthielten $\underline{\text{D}}\text{-(}^{14}\text{C(U))}\text{-Glukose}$ (New England Nuclear, 0,25 mCi, 3,2 mg in 2,5 ml 90% Äthanol), $\text{N-Acetyl-}\underline{\text{D}}\text{-(1-}^{14}\text{C)}\text{ Glukosamin}$ (Amersham Büchler, 0,5 mCi, 1,92 mg in 2,5 ml 2% Äthanol) und $(^3\text{H})\text{-Natriumacetat}$ (New England Nuclear, 5 mCi, 0,21 mg in 0,5 ml Äthanol). Die Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt. Nach 10 Stunden wurde das Wachstum durch Zugabe von Phenol (je 20 ml) gestoppt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, mit 10% und 96% Äthanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Das Lipopolysaccharid wurde durch Phenol/Wasser-Extraktion isoliert (Westphal et al., 1952), durch Phenol/Chloroform/Petroläther-Extraktion gereinigt (Galanos et al., 1969) und anschließend elektrodialysiert (vergl. E.4.6.). Ein Teil wurde in die Natriumform überführt: Suspension von Lipopolysaccharid (H^+ -Form) in Wasser, Neutralisation mit NaOH, anschließend Einfrieren der Lösung.

2. Darstellung von Lipopolysaccharid-Derivaten

2.1. Milde saure Hydrolyse von Lipopolysaccharid zur Gewinnung von Lipoid A

Doppelmarkiertes LPS (Na-Form) wurde mit nichtmarkiertem LPS gemischt und in 0,1 N Salzsäure 40 min. auf 100°C erhitzt. Der Niederschlag (Lipoid A) wurde abzentrifugiert und mit 0,1 N Salzsäure gewaschen.

2.2. Darstellung des fettsäurefreien Polysaccharides durch Hydrazinolyse (LPS-hydraz.)

Doppelmarkiertes LPS (Na-Form) wurde zusammen mit nichtmarkiertem LPS über Nacht im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet. Nach Zugabe von Hydrazin (Roth, wasserfrei und destilliert) wurde die Probe im abgeschmolzenen Röhrchen für 35 Stunden auf 105°C erhitzt. Das überschüssige Hydrazin wurde anschließend in der Kälte durch Zugabe von kaltem Aceton gebunden. Das Hydrazon wurde wie die Fettsäurehydrazide durch Waschen mit Aceton entfernt. Das Polysaccharid wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

2.3. Isolierung der Fettsäuren

2.3.1. Freisetzung der Fettsäuremethylester

Doppelmarkiertes LPS (H^+ -Form) wurde mit einer Lösung von Bortrifluorid in Methanol (14%, Merck) über Nacht bei 100°C umgesetzt. Die Fettsäuremethylester wurden nach Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung durch dreimalige Extraktion mit Chloroform gewonnen. Nach Verdunsten des Chloroforms wurden die Fettsäuremethylester dünn-schichtchromatographisch (E.2.3.2.) aufgetrennt.

2.3.2. Präparative Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung von Fettsäuremethylester

Das Fettsäureestergemisch wurde in Äther gelöst und auf einer Kieselgel-60-Fertigplatte (Schichtdicke 0,25 mm, Merck) aufgetragen. Als Laufmittel wurde eine Mischung von Petroläther, Äther und Eisessig (Volumenverhältnis 35:15:1) verwendet. Die Detektion der Fettsäureester erfolgte mit Jod (Joddämpfe in einer Jodkammer). Das radioaktive Fettsäuregemisch zeigte dabei keine Flecken. Deshalb wurde parallel ein Standardgemisch mit D-3-Hydroxymyristinsäuremethylester und Laurin- und Palmitinsäuremethylester chromatographiert. Die Flecken des radioaktiven Gemisches, die D-3-Hydroxymyristinsäure (R_f Wert 0,3-0,4) und den unversubstituierten Fettsäuren (R_f -Wert 0,7-0,95) entsprechen, wurden von der Glasplatte abgekratzt und im Probenverbrennungsgerät verbrannt.

3. Beschreibung der Tierversuche

3.1. Experimente mit Meerkatzen

Die Versuche mit den Meerkatzen wurden im Primate Center, Pinetown/Südafrika von Dr. Helms durchgeführt. Bei den verwendeten Affen handelte es sich um Meerkatzen der Spezies Cercopithecus pygerythrus, die in Südafrika aus der Wildbahn gefangen wurden. Diese wurden während des Versuches in Einzelkäfigen gehalten, bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung. Das Lipopolysaccharid-Präparat wurde in die Unterschenkelvene injiziert. Der Urin der Tiere wurde in Flaschen aufgefangen. Diese wurden morgens und abends während der Versuchszeit gewechselt und ohne Zusatzbehandlung tiefgefroren.

3.2. Experimente mit Ratten

Die verwendeten AS2-Albinoratten werden seit 1967 im MPI Freiburg in Bruder-Schwester-Verpaarung gezüchtet, seit 1971 unter spezifiziert-pathogenfreien Bedingungen.

Während der Versuchsdauer wurden die Ratten in Einzelkäfigen bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Der Käfigboden besteht aus einem Edelstahlsieb und einer abnehmbaren Bodenplatte mit einem Abfluß für Urin. Dieser wurde in einem Fläschchen aufgefangen. Der Kot wurde täglich von der Bodenplatte gesammelt. Kot und Urin wurden tiefgefroren.

4. Untersuchungen an Kot und Urin

4.1. Homogenisation von Kot

Die tiefgefrorenen Kotproben wurden gefriergetrocknet und in einem Mahlwerk (Krupps) zermahlen.

4.2. Dialyse im Dialyseschlauch

Es wurden Dialyseschläuche wechselnder Größe (Kalle, Wiesbaden) mit einem Ausschlußvolumen von ca. 10000 (D) verwendet. Diese wurden vor Gebrauch gewässert. Nach Einfüllen des Dialysegutes wurde mit einer Ausnahme (0,1 M EDTA) gegen destilliertes Wasser dialysiert. Wo es erwähnt ist, wurde das Dialysat aufgefangen und getrocknet. In den übrigen Fällen wurde nur die im Dialyseschlauch bleibende Lösung gewonnen und getrocknet, das Dialysat wurde verworfen.

4.3. Membranfiltration

Kotproben und Säuleneluate wurden in einer Dialysekammer (Amicon, 200 ml) eingengt und membranfiltriert. Die Membran (PM 10) hat eine Durchlässigkeit bis 10000 (D). Bei den Kotproben wurde auch das Filtrat getrocknet. Das Retentat wurde lyophilisiert.

4.4. Phenol/Wasser-Extraktion

Die Extraktion wurde nach Westphal et al. (1952) durchgeführt.

4.5. Phenolische Extraktion von Kot

Die Kotprobe (1 g) wurde in 20 ml 90% Phenol unter Erwärmen (50°C) und Ultraschall suspendiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben und der Rückstand noch zweimal mit Phenol ausgezogen. Der Rückstand wurde dann mit Aceton phenolfrei gewaschen. Die phenolische Lösung wurde mit Wasser versetzt, bis ein Niederschlag ausfiel. Der Überstand wurde durch Wasserdampfdestillation vom Phenol befreit und getrocknet. Der Niederschlag wurde in Wasser suspendiert und zentrifugiert. Das Sediment wurde in Wasser erneut suspendiert und wie der Überstand lyophilisiert.

4.6. Elektrodialyse von Kot und vorextrahierten Kotpräparaten

Die Proben wurden in durch zwei Dialysemembranen dreigeteilten Kammern verschiedener Größe elektrodialysiert. In den äußeren Kammern befinden sich die Elektroden. Die Mittelkammer wurde jeweils auf 4°C gekühlt. Strom und Spannung wurden auf maximal 200 V, 50 mA (80 mA) eingestellt. Das Wasser

in der kathodischen und der anodischen Kammer wurde mehrfach gewechselt. Nach der Elektrodialyse wurde die Lösung aus der Mittelkammer entnommen, wenn es erwähnt ist, zentrifugiert und mit Triäthylamin (TEN) neutralisiert. Nach Zentrifugation wurde das Sediment noch mit Wasser unter Kontrolle des pH-Wertes ausgezogen. Die Überstände und das Sediment wurden getrocknet. Die gesammelten Lösungen aus kathodischer und anodischer Kammer wurden neutralisiert und ebenfalls getrocknet. Das Material aus der kathodischen Kammer ist stark hygroskopisch.

4.7. Gelpermeationschromatographie

4.7.1. Gele und Säulen

Es wurden Glassäulen (Pharmacia, K25/70, K16/70 und K25/100) mit Kühlmantel und Probenauftragsteil verwendet.

Die Gele wurden im jeweiligen Puffer suspendiert. Nach Absitzen wurde die überstehende Lösung abgesaugt. Diese wurde wiederholt, bis keine Gelpartikel mehr in der Lösung schwebten. Anschließend wurde das Gel mit wenig Puffer aufgeschlemmt und im Wasserstrahlvakuum entgast. Die Suspension wurde dann in die Säule gegeben. Während des Absitzens des Geles wurde der Puffer mit einer bis um 50% höheren Elutionsgeschwindigkeit gepumpt als bei der Chromatographie selbst.

Nach Auftragen der Proben wurde das Eluat kontrolliert. Dabei wurde ein UV-Durchflußphotometer (LKB, Uvicord II), ein Durchflußfraktometer (RI, Winopal) und ein Dual-UV-RI-Detektor (Knaur) verwendet. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt (LKB Fraktionssammler).

4.7.2. Puffer bei der Gelpermeationschromatographie

Alle Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und entgast.

a) Pyridin/Acetat-Puffer:

44 ml Pyridin, 16 ml Eisessig in 2 ltr Wasser

b) 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,2:

60,57 g Tris wird in Wasser gelöst und mit konz. Salzsäure auf pH 7,2 eingestellt, anschließend wird mit Wasser auf 1 ltr. aufgefüllt. Diese 0,5 M Stammlösung wird vor Gebrauch fünffach verdünnt.

c) 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,2, 0,1% SDS:

Zu der 0,5 M Stammlösung (siehe b) werden 5 g SDS zugegeben. Weitere Verarbeitung wie bei b.

d) P1-Puffer:

Zu 20 ml 0,5 M Tris/HCl pH 7,2, 0,5% SDS (Stammlösung nach c) werden 1,9 g SDS, 5 ml Glycerin und 2,5 ml Mercaptoäthanol zugegeben. Mit Wasser wird auf 100 ml aufgefüllt. Dieser Puffer wird in 2 ml Portionen tiefgefroren und jeweils vor Gebrauch aufgetaut.

5. Der Aminosäureanalysator (nach Jensen nur ein Programm)

Für die qualitative oder quantitative Bestimmung von Aminosäuren sowie von Aminosäuren wurde ein automatischer Aminosäureanalysator (Modell Durrum D-500) benutzt. Für die Elution der Substanzen wurden die in Tabelle 27. beschriebenen Puffer und Programme verwendet.

Da die Aminosäuren fettsäurefrei sein müssen und als Monosaccharide vorliegen sollten, wurden die Proben vor der Untersuchung mit dem Aminosäureanalysator mit 4 N HCl 10 Stunden lang bei 100°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure gründlich im Vakuumexsiccator über

KOH-Rotuli entfernt.

Die Extinktionen wurden bei den beiden Wellenlängen 440 nm und 590 nm gemessen.

Tabelle 27.

Citrat-Puffer für Aminosäureanalysator Durrum D-500

	<u>A</u>	<u>B₁</u>	<u>B₂</u>	<u>C</u>
Molarität	0,20 M	0,20 M	0,38 M	1,10 M
Na-Citrat x 2H ₂ O	19,61 g	19,61 g	wie B ₁	39,22 g
Na-Cl	-	-	aber durch	40,90 g
Thiodiglycol	5 ml	5 ml	Zugabe von	-
HCl konz.	12,31 ml	8,37 ml	NaCl 0,38 M	0,3 ml
Phenol flüssig	1,0 ml	1,0 ml	machen	1,0 ml
Endvolumen	1,0 l	1,0 l		1,0 l
pH	3,29	4,25	4,25	7,90

	<u>Puffer</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
Programm:	A	0'-28'	50°C = 0'-20'
	B ₁	28'-42'	65°C = 20'-95'
	B ₂	42'-57'	
	C	57'-95'	

6. Immunologische Verfahren

6.1. Test der passiven Hämolysehemmung

6.1.1. Antigene

Die Antigene sind im Text bezeichnet. Als Vergleichsantigen wurde alkali-behandeltes S.abortus equi-LPS (LPS-OH) oder Lipoid A (Lipoid A-OH) verwendet.

6.1.2. Antiserum

Das Anti-S.abortus equi-Antiserum stammte vom Schaf. Es wurde aufgetaut

und zur Entfernung von Anti-Schaf-Aktivität in 2 ml Portionen mit Schafserythrozyten (0,2 ml Erythrozytensediment nach Waschen mit PBS (siehe Fußnote S. 84) bei 0°C eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und das adsorbierte Antiserum wieder tiefgefroren.

6.1.3. Beladung der Erythrozyten mit LPS-OH

Schafserythrozyten wurden dreimal mit PBS gewaschen. 0,1 ml Erythrozytensediment wurden in 5 ml PBS mit 50 µg LPS-OH (in 25 µl Wasser) eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten erneut mit PBS gewaschen. Es wurde eine 0,5% Suspension in Veronalpuffer* hergestellt.

6.1.4. Meerschweinchenkomplement

Als Komplementquelle wurde Meerschweinchenkomplement verwendet. Dieses wurde mit Schafserythrozyten von Anti-Schaf-Aktivität befreit (vergl. 6.1.2.). Vor Gebrauch wurde Komplement mit Veronalpuffer zehnfach verdünnt.

6.1.5. Bestimmung der hämolytischen Einheit des Antiserums

Auf einer Mikrotiterplatte wurde aus 25 µl Antiserum eine Verdünnungsreihe in 25 µl Veronalpuffer vorgelegt, ebenso eine Verdünnungsreihe mit 25 µl Antiserum, das 1:20 vorverdünnt war. Dazu wurden 25 µl der 0,5% Lösung der LPS-OH beladenen Erythrozyten und 25 µl 1:10 verdünntes Komplement

* Veronalpuffer: Isotonischer Kochsalz/Veronal-Puffer

0,85% NaCl; 0,05% = 5 mMol Veronal; 0,5 mMol MgCl₂; 0,15 mMol CaCl₂

gegeben. Nach Schütteln wurde die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die hämolytischen Einheiten wurden abgelesen. Das vorverdünnte Antiserum wurde auf 2 hämolytische Einheiten verdünnt (1 hämolytische Einheit: Die Menge Antiserum, die nach 1 Std. bei 37°C die Erythrozyten gerade noch lysiert).

6.1.6. Empfindlichkeitskontrolle

Es wurde a) mit 25 µl LPS-OH (2 mg/ml) und b) mit 25 µl LPS-OH (0,1 mg/ml) als Antigen eine Verdünnungsreihe in 25 µl Veronalpuffer vorgelegt. Nach Zugabe von zwei hämolytischen Einheiten in 25 µl Antiserum wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 25 µl LPS-OH beladene Erythrozyten (0,5% in Veronalpuffer) und 25 µl Komplement (1:10 verdünnt) zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Hemmung abgelesen. (Es hemmen in diesem System noch ca. 20 µg LPS-OH und 50 µg Lipoid A-OH.)

6.1.7. Bestimmung der passiven Hämolysehemmung

Der Versuch wurde wie in 6.1.6. durchgeführt. Die untersuchten Antigene, an Stelle von LPS-OH, sind im Text bezeichnet.

6.2. Immunadsorption

6.2.1. Herstellung der S.abortus equi-Immunsäule

6.2.1.1. Aktivierung von AH-Sepharose 4B

6 g AH-Sepharose 4B (Pharmacia) wurde in 1,2 ltr. 0,5 M Kochsalzlösung gequollen und anschließend mit 300 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die gequollene und gewaschene AH-Sepharose 4B wurde in 150 ml PBS suspen-

diert. Zu dieser Suspension werden 30 ml einer 10% Lösung von Glutardialdehyd (Merck) gegeben, danach wurde über Nacht langsam geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die aktivierte Sepharose mit Wasser (ca. 2 ltr.) gewaschen und in PBS-Azid (0,02%)-Puffer aufbewahrt.

6.2.1.2. Kupplung von LPS-hydraz. an aktivierte AH-Sepharose 4B

29,1 mg LPS-hydraz. wurden in PBS gelöst. Diese Lösung wurde mit einer Suspension von 3 g aktivierter AH-Sepharose 4B in 150 ml PBS über Nacht geschüttelt. Danach wurden mit 2 ltr. Wasser gewaschen. Zur Blockierung freier Aldehydgruppen wurde mit 10 ml einer 1 M Äthanolaminlösung überschichtet (unter gelegentlichem Schütteln, 2 Stunden). Anschließend wurde mit Wasser und PBS gewaschen und die S.abortus equi-Sepharose 4B in PBS-Azid-Puffer aufbewahrt.

6.2.2. Isolierung von gereinigten Anti-S.abortus equi-Antikörpern

1,5 ml S.abortus equi-Sepharose 4B und 55 mg Kaninchen-IgG, nach Immunisierung gegen S.abortus equi (von Dr. Freudenberg freundlicherweise zur Verfügung gestellt), wurden in PBS eine halbe Stunde inkubiert. Die Suspension wurde in eine kleine Säule gegeben und bis zum Verschwinden einer Absorption bei 280 nm (Uvicord II, LKB) mit PBS gewaschen. Danach wurde mit 0,1 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,8 in vorgelegtes, 10fach-konzentriertes PBS eluiert. Nach Absinken der Extinktion unter 0,01 wurde das Sammeln abgebrochen. Die Säule wurde bis zur Konstanz der Extinktion mit Glycin/HCl-Puffer eluiert, anschließend mit PBS äquilibriert.

Das Glycin/HCl-Eluat wurde durch Unterdruckdialyse eingeengt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Durch Hämolyse wurde die Aktivität der

isolierten Antikörper getestet. Mit LPS-OH-beladene Schafserthrozyten wurden von den isolierten Antikörpern bis zu einer Verdünnung von 1:2048 in Gegenwart von Komplement lysiert (vergl. 6.1.5.).

6.2.3. Herstellung der Anti-S.abortus equi-Immunsäule

Zu der Lösung der isolierten Antikörper (aus 6.2.2.) wurde spatelweise aktivierte AH-Sepharose 4B gegeben, bis die Extinktion bei 280 nm auf unter 0,35 gesunken war. Der Überstand lysierte noch in einer Verdünnung von 1:128, d.h. es lagen nur noch weniger als 5% der Antikörper in freier Form vor.

Die Suspension wurde in eine kleine Säule gefüllt und mit PBS gewaschen, bis keine Extinktion bei 280 nm mehr meßbar war (Anti-S.abortus equi-Sepharose).

6.2.4. Immunadsorption an Anti-S.abortus equi-Sepharose 4B

Die zu adsorbierende Lösung wurde mit der in 6.2.3. beschriebenen Anti-S.abortus equi-Sepharose 4B 2 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen. Die erste Elution erfolgte mit Glycin/HCl-Puffer (0,1 M, pH 2,8). Danach wurde die Säule mit PBS gewaschen. Die zweite Elution erfolgte mit 3 M KSCN Lösung. Anschließend wurde die Säule mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,2, 0,1% SDS behandelt. Die Radioaktivitäten in den verschiedenen Eluatzen wurden bestimmt.

7. Radioaktivitätsmessungen

7.1. Verwendete Materialien und Geräte bei der Flüssigkeitsszintillationszählung

Aquasol	(New England Nuclear), ein ^3H - und ^{14}C -Szintillationscocktail auf Xylolbasis.
Szintigel	(Roth), ein gebrauchsfertiger Universalszintillator für wäßrige, ^3H - und ^{14}C -enthaltende Proben.
Monophase 40	(Packard), ^3H -Szintillator, gebrauchsfertige Lösung für Packard Sample Oxidizer 306 auf Xylolbasis.
Carbosorb	(Packard), CO_2 -Absorbens für Oxidizer 306, der ein organisches Arylamin enthält.
Permafluor V	(Packard) ^{14}C -Szintillator, gebrauchsfertige Lösung auf Toluolbasis für Oxidizer 306.
Perchlorsäure	(Baker) 70% wäßrige Lösung.
Wasserstoffperoxid	(Riedel de Haen) 35% wäßrige Lösung
20 M Natronlauge	

Als Meßfläschen wurden Plastikflaschen der Fa. Packard und der Fa. Zinsser mit einem Volumen von 22 ml verwendet.

Die Messungen wurden in Geräten der Fa. Packard, den TriCarb-Liquid-Szintillations-Spectrometern $\text{N}^0. 2450$ oder $\text{N}^0. 3385$ durchgeführt. Entweder wurde bei den vom Hersteller vorgegebenen Verstärkungen oder bei einer Einstellung von 15 für ^{14}C und 55 für ^3H gemessen.

7.2. Vorbereitung der Proben für die Szintillationszählung

7.2.1. Wäßrige Proben

Wäßrige Lösungen (Eluate der Säulenchromatographie) wurden mit 5 ml (Probenvolumen 500 µl) oder 10 ml (Probe 1 ml) Aquasol versetzt.

7.2.2. Urinproben

Einfach markierte Urinproben wurden in den angegebenen Volumenverhältnissen mit Aquasol oder Szintigel versetzt und gemessen. Die ^{14}C - und ^3H -Standardproben wurden von Dr. Ferber (MPI Freiburg) überlassen.

0,5 ml ^3H , ^{14}C -Rattenurin wurde mit 0,2 ml Combustaid (Packard) im Oxidizer 306 (Packard) verbrannt; Einstellung 15 ml Monophase 40, 9 ml Carbosorb und 11 ml Permafluor V; vergl. 7.2.3.3.

7.2.3. Kotproben

7.2.3.1. Oxidation der Proben mit Wasserstoffsuperoxid/Perchlorsäure

Die Proben wurden in den Meßfläschchen eingewogen, mit 0,75 ml 35% H_2O_2 -Lösung und mit 0,25 ml 70% HClO_4 -Lösung versetzt. Die Fläschchen wurden sofort verschlossen. Die Aluminium-Kork-Dichtung ist durch eine Gummidichtung ersetzt, außerdem sind die Plastikdeckel durchbohrt. Nach 1 Stunde bei 70°C auf dem Wasserbad wurden die Proben in Eis gekühlt. Durch das Loch im Deckel und die Gummidichtung wurden 0,5 ml einer 20 M NaOH-Lösung mit einer Plastikeinwegspritze (Nadelstärke N^o 18) zugespritzt. Das Gläschen wurde intensiv geschüttelt und 30 Minuten stehengelassen. Nach Öffnen des Deckels wurde 15 ml Aquasol zugegeben und intensiv geschüttelt.

7.2.3.2. Saure Hydrolyse und anschließende Oxidation der Proben

Die eingewogenen Proben wurden in Schraubglasfläschchen mit 1 ml Salzsäure (0,1 N, 1 N oder 4 N) 1 Stunde auf dem Wasserbad bei 100°C erhitzt.

Nach Zentrifugation (Labofuge II, Heraeus 4000 U/min) wurden die Überstände in ein Szintillationsmeßfläschchen überführt und das Sediment einmal mit 1 ml Wasser gewaschen. Die vereinigte Überstände wurden mit 0,25 ml 35% H_2O_2 versetzt. Wenn sich die Lösung entfärbt hatte, wurde 0,25 ml (bei 4 N Salzsäure 0,5 ml) 20 M NaOH-Lösung zugegeben.

Die Sedimente der Hydrolyse wurden mit 1 ml 35% H_2O_2 -Lösung in ein Meßfläschchen gespült und mit 0,25 ml 70% HClO_4 -Lösung versetzt. Die Fläschchen wurden sofort dicht verschlossen und 1 Stunde bei 70°C auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen in Eis wurde durch die Gummidichtung (siehe 7.2.3.1.) Natronlauge (0,5 ml 20 M) zugespritzt, intensiv geschüttelt, 30 Minuten stehengelassen und nach Öffnen des Deckels 15 ml Aquasol zugeetzt.

Sowohl die Proben aus 7.2.3.1. als auch die aus 7.2.3.2. wurden nach der ersten Messung mit ^{14}C -Standard (^{14}C -Acetat) versetzt und erneut gemessen. Ebenso wurden Kontrollproben von nichtmarkiertem Kot und reinem Präparat 4 untersucht.

7.2.3.3. Oxidation mit dem Probenverbrennungsgerät (Sample Oxidizer)

Kotproben wurden eingewogen und mit Zellulose (Packard, rückstandsfrei verbrennend) gemischt und in einem Probentöpfchen in die Verbrennungskammer des Oxidizers (Packard, Modell 306) gebracht. Das bei der Verbrennung entstehende Wasser wird mit dem ^3H -Szintillator Monophase 40 (15 ml) in ein Meßfläschchen gespült, das CO_2 mit Carbosorb (9 ml) als Carbaminat

absorbiert, in ein zweites Meßfläschchen gespült und mit Permafluor V (11 ml) versetzt.

Testläufe ergeben eine Wiederfindungsrate von 98,7% für ^3H und von 99,7% für ^{14}C . Tritium wird zu weniger als 0,1% und ^{14}C zu weniger als 0,05% in die nächste Probe verschleppt. Die Trennung beider Isotopen ist besser als 99,9%. Gemessen wurden diese Werte mit $6,8 \times 10^4$ ^{14}C -CpM und $4,2 \times 10^4$ ^3H -CpM.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Altman, Ph.L. und D.S. Dittmer (Hrsgb.) (1974)

Biology data book, II. ed. Vol. III

Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Bethesda, Md., S. 1989

Andressen, R. (1974)

Untersuchungen zur Adjuvanzaktivität und Mitogenität von Lipopolysacchariden

Doktorarbeit, Freiburg/Breisgau

Beckmann, I., O. Lüderitz und O. Westphal (1964)

Zur Immunchemie der somatischen Antigene von Enterobacteriaceae

IX. Serologische Typisierung von Salmonella R-Antigenen

Biochem. Zeitschr. 339, 401

Boivin, A. (1946)

Travaux recents sur la constitution chimiques et sur les propriétés biologiques des antigènes bactériens

Schw. Ztschr. Pathol. Bact. 2, 505

Boivin, A., I. Mesrobianu und L. Mesrobianu (1933)

Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du Bacille d'Aertrycke

C.R. Soc. Biol. 114, 307

Boivin, A. und L. Mesrobianu (1933)

Contribution à l'étude de la composition chimiques des bactéries. Substances azotées et phosphorées "acido-solubles"

C.R. Soc. Biol. 112, 76

Boivin, A. und L. Mesrobianu (1936)

L'antigène somatique complet (antigène O) de certaine bactérie est la constituant principal de leur endotoxine.

Rev. Immunol. 2, 113

Boivin, A. und L. Mesrobian (1937)

Antigène somatique O "complet" et variations bactériennes
Rev. Immunol. 3, 319

Bona, C.A. (1973)

Fate of endotoxins in macrophages, biological and ultrastructural aspects
aus: Bacterial Lipopolysaccharides, E. Kass und S. Wolff (Ed.)
The University of Chicago Press, S. 66

Braude, A.I., F.J. Carey, D. Sutherland und M. Zalesky (1955)

Studies with radioactive endotoxin. I. The use of ^{51}Cr to label endotoxin of
E.coli

J. Clin. Invest. 34, 850

Braude, A.I., F.J. Carey und M. Zalesky (1955a)

Studies with radioactive endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with
the distribution of radioactivity

J. Clin. Invest. 34, 858

Centanni, E. (1894)

Untersuchungen über das Infektionsfieber - das Fiebergift der Bakterien
Dtsch. Med. Wochenschr. 20, 148

Chedid, L. und M. Parant (1961)

Study of the tolerance of adrenalectomized mice using endotoxin with ^{51}Cr
Ann. Inst. Pasteur, Paris 101, 170

Coutinho, A. und T. Meo (1978)

Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57Bl/10Cr mice
Immunogen. 7, 17

Dinareello, Ch.A., N.P. Goldin und S.M. Wolff (1974)

Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyro-
gens

J. Exp. Med. 139, 1369

Feldberg, W. (1975)

Body temperatur and fever: changes in our views during the last decade
Proc. R.Soc. Lond.B 191, 199

Freudenberg, M.A., T.C. Byg-Hansen, U. Back und Ch. Galanos (1980)

Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density-lipoproteins in rats.

Inf. Immun. 28, 373

Fromme, I., K. Himmelspach, O. Lüderitz und O. Westphal (1957)

Analyse der Zuckerbausteine in bakteriellen Lipopolysacchariden - Abequose und Tyvelose als 3,6-Bisdesoxy-aldohexosen

Angew. Chem. 69, 643

Galanos, Ch. (1975)

Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component

Z. Immun.-Forsch. 149, 214

Galanos, Ch., M.A. Freudenberg, S. Hase, F. Jay und E. Ruschmann (1977a)

Biological activities and immunological properties of lipid A

Microbiology 1977, S. 269

Galanos, Ch., M.A. Freudenberg und F. Jay (1978)

Biologie der Endotoxine Gram-negativer Bakterien

Arzneim. Forsch. 28, 1202

Galanos, Ch., M.A. Freudenberg, O. Lüderitz, E.Th. Rietschel und O. Westphal (1979a)

Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial lipopolysaccharide

aus: Biomedical applications of the horseshoe crab (Limulidae)

Alan R. Liss Inc., New York, S. 321

Galanos, Ch., M.A. Freudenberg und W. Reutter (1979b)

Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin

Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5939

Galanos, Ch. und O. Lüderitz (1975)

Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms

Eur. J. Biochem. 54, 603

Galanos, Ch., O. Lüderitz, E.Th. Rietschel und O. Westphal (1977)

Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides with special reference to their lipid A component

Int. Rev. Biochem. 14, 239

Galanos, Ch., O. Lüderitz und O. Westphal (1969)

A new method for the extraction of R lipopolysaccharides

Eur. J. Biochem. 9, 245

Galanos, Ch., O. Lüderitz und O. Westphal (1979)

Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from Salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal)

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 243, 226

Gutowski, J. und D.M. Jacobs (1979)

A solid-phase radioimmunoassay for bacterial lipopolysaccharide

Immunol. Comm. 8, 347

Jones, G.W. (1975)

Adhesive properties of enteropathogenic bacteria

Microbiology 1975, S. 137

Kasai, N., Y. Hayashi und N. Komatsu (1970)

On the basal structure especially the molecular weight of the lipid moiety of endotoxin

Japan. J. Med. Sci. Biol. 23 (5), 361

Kauffmann, F. (1972)

Serological diagnosis of Salmonella species; Kauffmann-White-Schema

Munksgaard, Kopenhagen, Dänemark

Kim, Y.B. und D.W. Watson (1967)

Biologically active endotoxins from Salmonella mutants deficient in O- and R-polysaccharides and heptose

J. Bacteriol. 94, 1320

Lehmann, V., E. Rupprecht und M.J. Osborn (1977)

Isolation of mutants conditionally blocked in the biosynthesis of the 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid lipid A part of lipopolysaccharides derived from Salmonella typhimurium

Eur. J. Biochem. 76, 41

Lüderitz, O., A.M. Staub und O. Westphal (1966)

Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae

Bacteriol. Rev. 30, 192

Malchow, D., O. Lüderitz, B. Kickhöfen, O. Westphal und G. Gerisch (1969)

Polysaccharides in vegetative and aggregation-competent amoebae of Dictyostelium discoideum. 2. Purification and characterization of amoeba-degraded bacterial polysaccharides

Eur. J. Biochem. 7, 239

Malchow, D., O. Lüderitz, O. Westphal, G. Gerisch und V. Riedel (1967)

Polysaccharide in vegetativen und aggregationsreifen Amöben von Dictyostelium discoideum. 1. In vivo-Degradierung von Bakterien-Lipopolysaccharid

Eur. J. Biochem. 2, 469

Mathison, J.C. und R.J. Ulevitch (1979)

The clearance, distribution and cellular localization of lipopolysaccharide (LPS) in rabbits

Fed. Proc. 38, 1455

Neter, E. (1969)

Endotoxins and the immune response

Curr. Top. Microb. Immunol. 47, 82

Nikaido, H. (1973)

Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide and the outer membrane of Gram-negative cell wall

aus: Bacterial membranes and walls, L. Leive (Ed.)

Marcel Decker Inc., N.Y., S. 131

Nikaido, H. und T. Nakae (1979)

The outer membrane of Gram-negative bacteria

aus: Advances in microbial physiology, A.H. Rose und J.G. Morris (Ed.)

Vol. 20, S. 163

Oroszlan, S.I., V.W. McFarland, P.T. Mora und M.J. Shear (1966)

Reversible inactivation of an endotoxin by plasma proteins

Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 622

Oroszlan, S.I. und P.T. Mora (1963)

Dissociation and reconstitution of an endotoxin

Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 345

Pfeiffer, R. (1892)

Untersuchungen über das Choleragift

Zt. f. Hygiene 11, 393

Rietschel, E.Th., O. Galanos, O. Lüderitz und O. Westphal (im Druck)

Chemical structure, physiological function and biological activity of lipopolysaccharides and their lipoid A component

aus: Immunopharmacology, D.R. Webb (Ed.)

M. Decker, Inc.

Rietschel, E.Th. und O. Lüderitz (1980)

Struktur von Lipopolysaccharid und Taxonomie Gram-negativer Bakterien

Forum mikrobiologie 1, 12

Rietschel, E.Th., U. Schade, M. Jensen, H.-W. Wollenweber, O. Lüderitz und S.G. Greismann (im Druck)

Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia

Scand. J. Inf. Dis.

Romeo, D., A. Girard und L. Rothfield (1970)

Reconstitution of a functional membrane enzyme system in a mono-molecular film

J. Mol. Biol. 53, 475

Rudbach, J.A. und A.G. Johnson (1964)

Restoration of endotoxin activity following alteration by plasma

Nature 202, 811

Rutenburg, S., R.C. Skarnes, C. Palmerio und J. Fine (1967)

Detoxification of endotoxin by perfusion of liver and spleen

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 455

Saddler, J.N., J.G. Coote und A.C. Wardlaw (1979)

Degradation of bacterial lipopolysaccharide by the slime mould Physarum polycephalum

Can. J. Micro. 25, 124

Saddler, J.N., R. Parton und A.C. Wardlaw (1979a)

Degradation of bacterial lipopolysaccharide by gut juice of the snail Helix pomatia

Experientia 35, 494

Schlecht, S. (1975)

Wachstum und Lipopolysaccharidgehalt bei Submerszüchtungen nach dem Batch-Verfahren. 2. Mitt. Einfluß der Wachstumsphase auf die Lipopolysaccharidsynthese

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 232, 61

Selye, H., B. Tuckweber und L. Bertok (1966)

Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins

J. Bacteriol. 91, 884

Skarnes, R.C. (1966)

The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum

Ann. N.Y. Acad. Sci. 133, 644

Skarnes, R.C. (1968)

In vivo interaction of endotoxin with a plasma lipoprotein having esterase activity

J. Bacteriol. 95, 2031

Skarnes, R.C. und J.C. Chedid (1964)

Biological degradation and inactivation of endotoxin (chromate-labeled)
aus: Bacterial endotoxins, M. Landy and W. Braun (Ed.)

Rutgers Univ. Press, New Brunswick, N.J., S. 575

Sultzter, B.M. (1972)

Genetic control of host responses to endotoxin

Inf. Immun. 5, 107

Tanford, Ch. (1980)

The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes
Wiley and sons, N.Y.

Thompson, R.C. (1952)

Studies of metabolic turnover with tritium as a tracer II. Gross studies on the rat

J. Biol. Chem. 200, 731

Ulevitch, R.J. (1978)

The preparation and characterization of a radioiodinated bacterial lipopolysaccharide

Immunochem. 15, 157

Ulevitch, R.J. und A.R. Johnston (1978)

The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum

J. Clin. Invest. 62, 1313

Watson, J., K. Kelly, M. Largen und B.A. Taylor (1978)

The genetic mapping of a defective LPS response gene in C3H/HeJ mice

J. Immunol. 120, 422

Weil, E. und A. Felix (1918)

a) Untersuchungen über die gewöhnlichen Proteus-Stämme und ihre Beziehungen zu den X-Stämmen

Wien. Klin. Wochenschr. 31 (23), 637

b) Über die Doppelnatur der Rezeptoren bei Paratyphus β

Wien. Klin. Wochenschr. 31 (23), 986

Weinstein, D.B. und R.J. Ulevitch (1978)

A new "protective" role for high-density-lipoprotein (HDL): detoxification of endotoxins

Circul. 58 (suppl.), II-90

Westphal, O. (1975)

Bacterial endotoxins (the second Carl Prausnitz memorial lecture)

Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49, 1

Westphal, O. und O. Lüderitz (1954)

Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien

Angew. Chem. 66, 407

Westphal, O., O. Lüderitz und F. Bister (1952)

Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser

Zt. Naturf. 7b, 148

Westphal, O., O. Lüderitz, E. Eichelberger und W. Keiderling (1952a)

Über bakterielle Reizstoffe. I. Mitt. Reindarstellung eines Polysaccharid-Pyrogens aus Bacterium coli

Zt. Naturf. 7b, 536

Zlydaszyk, J.C. und R.J. Moon (1976)

Fate of ^{51}Cr -labeled lipopolysaccharide in tissue culture cells and livers of normal mice

Inf. Immun. 14, 100

LEBENS LAUF

Am 18. Mai 1952 wurde ich als Sohn des Dr. Wilhelm Kleine und seiner Frau Brigitte, geb. Laufkötter, in Duisburg-Hamborn geboren.

Von 1958 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Duisburg-Hamborn, von 1959 bis 1962 die katholische Volksschule an der Wotanstraße in Gelsenkirchen-Buer. Anschließend besuchte ich das Max-Planck-Gymnasium in Gelsenkirchen-Buer, wo ich im Juli 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1970 bis 1976 studierte ich an der Universität Dortmund, wo ich 1972 die Diplomprüfung und im April 1975 die Diplomhauptprüfung im Fach Chemie ablegte. Von Mai 1975 bis Januar 1976 fertigte ich die schriftliche Diplomarbeit unter der Anleitung von Dr. habil. T.N. Mitchell am Lehrstuhl für organische Chemie von Prof. W.P. Neumann an.

In der Zeit von Februar 1976 bis Mai 1977 leistete ich Ersatzdienst im Diözesanbüro der Katholischen Studierenden Jugend Erzdiözese Paderborn.

Die vorliegende Arbeit führte ich von Juni 1977 bis Dezember 1980 im Max-Planck-Institut für Immunbiologie Freiburg i.Br. durch.

